

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
EINES
RIFAMYCIN-BINDENDEN PROTEINS
AUS DEM
PERIPLASMA VON ESCHERICHIA COLI**

FRIEDERIKE SEYDEL geb. Böltz

München 1978



**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
EINES
RIFAMYCIN-BINDENDEN PROTEINS
AUS DEM
PERIPLASMA VON ESCHERICHIA COLI**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

FRIEDERIKE SEYDEL geb. Böltz

München 1978



1. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Hartmann
 2. Berichterstatter: Prof.Dr.E.-L.Winnacker
- Tag der mündlichen Prüfung: 27.Juli 1978

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1975 bis Juni 1978 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr.G.Hartmann am Institut für Biochemie der Universität München ausgeführt.

Frau Ilka Skrobek danke ich für das Überlassen unveröffentlichter Ergebnisse.

Bei allen dem Arbeitskreis Zugehörigen, die durch Diskussion und praktische Hilfe diese Arbeit unterstützten, möchte ich mich herzlich bedanken.

Die Berechnung der Regressionsgeraden erfolgte mit fachkundiger Unterstützung meines Mannes.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Einleitung</u>	1
<u>Material und Methoden</u>	
<u>Material</u>	4
<u>Methoden</u>	6
1. Bakterienstämme	6
2. Anzucht von Bakterien	6
2.1. Anzucht zur Isolierung von rb-Protein	6
2.2. Anzucht exponentieller Zellen für osmotischen Schock und Messung der Rifampicinaufnahme	7
2.3. Anzucht stationärer Zellen	7
3. Affinitätschromatographie	7
3.1. Herstellung von N-Demethylrifampicin-Sephrose	7
3.2. Aufstellung der angewandten Tris-Puffer	8
3.3. Isolierung von rb-Protein durch Harnstoffelution	9
3.4. Isolierung von rb-Protein durch spezifische Elution	10
4. Cellogel-Elektrophoresen	10
4.1. Handhabung	10
4.2. Elektrophorese auf Cellogelstreifen (analytisch)	11
4.3. Elektrophorese auf Cellogelblöcken zur Isolierung von rb-Protein (präparativ)	11
5. Polyacrylamidgel-Elektrophoresen	12
5.1. Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Rundgele	12
5.2. Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Plattengele	13
5.3. Discgel-Elektrophorese	14
5.4. Normalgel-Elektrophorese	15
5.5. Auswertung der Gele	15
6. Proteinbestimmung	15
Konzentrierung von Proteinproben für die Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	16
7. Dünnschichtchromatographie	16
8. Zentrifugation im Sucroседichte gradienten	17

	Seite
9. Photospektrometrische Konzentrationsbestimmung von Rifampicin- und [^3H]Rifampicinlösungen	17
10. Radioaktivitätsmessung	18
11. Spezifische Radioaktivität von [^3H]Rifampicin und Aufbewahrung der Lösungen	19
12. Gleichgewichtsdialysen	19
12.1. Durchführung	19
12.2. Auswertung der Meßergebnisse nach Scatchard (1949)	20
12.3. Ermittlung des bis zur Gleichgewichtseinstellung nötigen Dialysezeitraums	21
12.4. Stabilität des rb-Proteins unter den Bedingungen der Gleichgewichtsdialyse	21
12.5. Zur Fehlerbreite bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten	23
12.6. Vorversuch mit RNA-Polymerase aus <u>E.coli</u>	25
12.7. Einfluß von Polyäthylenglykol-Verunreinigungen auf die Bindung von [^3H]Rifampicin durch Rinderserumalbumin	26
13. Osmotischer Schock	27
13.1. Durchführung des Schocks	27
13.2. Bestimmung von β -Galaktosidase-Aktivität	28
14. Messung der [^3H]Rifampicinaufnahme von ganzen und schockbehandelten Zellen	29
<u>Ergebnisse und Diskussion</u>	31
<u>I. Isolierung von rb-Protein aus <u>E.coli</u> B (rpoB-Mutante)</u>	31
1. Isolierung von rb-Protein durch Harnstoff-elution von Rifampicin-Sepharose	31
1.1. Affinitätschromatographie	31
1.2. Cellogelelektrophorese	34
1.3. Reinheitsprüfung	36
a Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von 0.1% Dodecylsulfat und Untersuchung auf Protease-Verunreinigungen	36
b Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen	37
1.4. Erneute Bindung des renaturierten Proteins an Rifampicin-Sepharose	39
Untersuchungen zur Bindung der Begleitproteine	39

	Seite
2. Isolierung von rb-Protein durch spezifische Desorption mit Rifampicin	43
2.1. Nachweis der spezifischen Bindungsaffinität für Rifampicin und Rifamycin SV	43
2.2. Isolierung von rb-Protein durch spezifische Desorption	45
<u>II.</u> Nachweis von spezifisch eluierbarem rb-Protein in <u>E.coli</u> B 1175 (Wildstamm)	50
<u>III.</u> Eigenschaften des rb-Proteins aus <u>E.coli</u> B (rpoB-Mutante)	52
1. UV-Spektrum	52
2. Molekulargewicht in Gegenwart von Dodecylsulfat	53
3. Molekulargewicht im nativen Zustand	55
3.1. Dünnschichtchromatographie an Sephadex G-200	55
3.2. Disc-Elektrophorese	55
a renaturiertes rb-Protein	56
b spezifisch eluiertes rb-Protein	60
3.3. Zentrifugation im Sucroседichtegradienten	61
Zusammenfassung	62
<u>IV.</u> Auswirkung der spezifischen Bindung auf molekulare Eigenschaften von rb-Protein und Rifampicin	64
1. Vergleich der Spektren von rb-Protein und Rifampicin in freiem und gebundenem Zustand	65
2. Elektrophoretisches Verhalten des rb-Proteins nach Inkubation mit Rifampicin	67
a spezifisch eluiertes Protein	68
b renaturiertes Protein	71
<u>V.</u> Affinität des rb-Proteins zu Rifampicin - Ermittlung der Dissoziationskonstanten durch Gleichgewichtsdialyse	71
a spezifisch eluiertes Protein	73
b renaturiertes Protein (dimerer Zustand)	75
c renaturiertes Protein (teilweise tetramerer Zustand)	77
d vergleichende Betrachtung	79

	Seite
<u>VI.</u> Lokalisation des rb-Proteins in der <u>E.coli</u> -Zelle - Untersuchung durch osmotischen Schock	80
1. <u>E.coli</u> B (Wildtyp)	82
a Plasmolyse-Überstand	82
b Schockflüssigkeit	83
c Zellhüll- und Membranpräparationen von <u>E.coli</u> CR 34	85
2. rpoB-Mutante von <u>E.coli</u> B	89
a Plasmolyse-Überstand	89
b Schockflüssigkeit	89
3. Vergleich zwischen Wildtyp und rpoB-Mutante	93
<u>VII.</u> Einfluß des osmotischen Schocks auf die Rifampicinaufnahme von <u>E.coli</u> B	95
<u>VIII.</u> Anteil des rb-Proteins am Gesamtprotein ganzer Zellen in Abhängigkeit vom Wachstumsstadium der Zellen	99
<u>IX.</u> Überprüfung einer möglichen Identität des rb-Proteins mit Protease I aus <u>E.coli</u>	101
<u>Abschließende Betrachtungen</u>	104
Ubiquitäres Vorkommen des rb-Proteins in <u>E.coli</u> -Stämmen	104
Bindungsspezifität für Rifampicin und Rifamycin SV	104
Lokalisation im Periplasma und Vergleich mit periplasmatischen bindenden Proteinen	105
Betrachtungen zur möglichen Funktion des rb-Proteins bei der Aufnahme von Rifamycinen in die Zelle	106
<u>Literaturverzeichnis</u>	111
<u>Zusammenfassung</u>	117
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	119
Lebenslauf	

Einleitung

DNA-abhängige RNA-Polymerase (E.C.2.7.7.6.) aus Bakterien bindet das Antibiotikum Rifampicin mit hoher Spezifität und großer Affinität (Wehrli and Staehelin, 1971). H.Lill (Würzburg 1972, unveröffentlicht) hat versucht, diese Eigenschaft des Enzyms zur Reinigung durch Affinitätschromatographie auszunutzen. Hierbei tritt das Problem auf, Rifampicin derart kovalent an die Trägermatrix zu binden, daß dadurch die Affinität des Enzyms zu Rifampicin, die bereits durch geringfügige Änderungen im Antibiotikums-molekül stark herabgesetzt wird (Wehrli and Staehelin, 1969), nicht verlorengeht. Für die kovalente Bindung an die Trägermatrix bot sich daher der chemisch in das Rifampicin-molekül eingeführte Piperazinyl-iminomethyl-Rest an. H.Lill und G.Hartmann (Würzburg 1972, unveröffentlicht) entschlossen sich zur Verwendung des kommerziell erhältlichen N-Demethylrifampicin (Abb.30), das über die endständige, sekundäre Aminogruppe leicht an CNBr-aktivierte Sepharose kovalent gebunden werden kann. Scheit und Stütz (1975) lösten dieses Problem unabhängig durch Verwendung des Derivats 3-(2-Aminoäthyl)-thiorifamycin SV, das nicht kommerziell erhältlich ist.

Filtrierte man einen Zellextrakt aus E.coli MRE 600 mit rifampicin-bindender DNA-abhängiger RNA-Polymerase durch eine mit N-Demethylrifampicin beladene Sepharose-Säule, so wird RNA-Polymerase adsorbiert. Desorption mit einer Lösung, die 6M Harnstoff enthält, liefert ein Eluat, in dem sich durch Elektrophorese in dodecyl-sulfathaltigen Polyacrylamidgelen die Untereinheiten der RNA-Polymerase nachweisen lassen (I.Skrobek, H.Lill und G.Hartmann, Würzburg 1973, unveröffentlicht). Bei der Elektrophorese wurden aber nicht nur die Untereinheiten der RNA-Polymerase beobachtet, sondern - neben einigen Proteinbanden geringer Intensität - eine vergleichsweise intensive, zusätzliche Proteinbande mit relativ hoher elektrophoretischer Beweglichkeit. Dieser Befund war überraschend, da man aufgrund der Versuche von Wehrli et al.(1968) mit rifampicinresistenten E.coli - Mutanten vermuten mußte, daß in Escherichia coli nur ein einziges Protein, nämlich DNA-abhängige RNA-Polymerase, in der Lage ist, sich an Rifampicin-Sepharose zu

binden. Anschließend, nicht abgeschlossene Versuche von I.Skrobek wandten sich deshalb der näheren Untersuchung dieses neben der RNA-Polymerase bei der Rifampicin-Affinitätschromatographie beobachteten Proteins zu.

Für die Adsorption dieses Proteins an Rifampicin-Sephrose können mehrere Gründe verantwortlich sein:

1. Das beobachtete Protein wird nicht an das Säulenmaterial, sondern an die an den Liganden gebundene RNA-Polymerase adsorbiert.
2. Das Protein wird an die Sepharosematrix, nicht aber an den Liganden Rifampicin gebunden.
3. Das Protein bindet, ähnlich wie RNA-Polymerase, spezifisch an den Liganden Rifampicin.

Die erste Hypothese war aufgrund der Versuche von D.Ratner (1974) wenig wahrscheinlich. Dieser beobachtete nämlich, daß bei der Affinitätschromatographie von Zellextrakten aus E.coli B/r/T1 an Sepharose, die mit RNA-Polymerase als Affinitätsligand beladen war, zwar 12 - 15 Polypeptide relativ fest gebunden werden, doch besitzt keines dieser Proteine bei der Elektrophorese in dodecyl-sulfathaltigen Gelen eine Beweglichkeit, die mit der des hier beschriebenen Proteins identisch ist. Die erste Hypothese konnte endgültig durch Versuche mit zellfreien Extrakten einer rpoB-Mutante von E.coli B mit rifampicinresistenter RNA-Polymerase ausgeschlossen werden. Denn bei der Affinitätschromatographie solcher Extrakten an Rifampicin-Sephrose konnte das Protein durch Elution mit Harnstofflösung frei von RNA-Polymerase gewonnen werden (I.Skrobek und G.Hartmann, 1973, unveröffentlicht). Auch die zweite Hypothese (Bindung an die Sepharosematrix) konnte ausgeschlossen werden. Wird nämlich an aktivierte Sepharose Athanolamin anstelle von N-Demethylrifampicin gebunden, so kann das hier interessierende Protein aus dem zellfreien Extrakt der rpoB-Mutante nicht adsorbiert werden (I.Skrobek und G.Hartmann, 1973, unveröffentlicht).

Es mußte also eine direkte Wechselwirkung dieses Proteins mit dem Liganden N-Demethylrifampicin angenommen werden. Aus diesem Grund wird das Protein in der vorliegenden Arbeit als rb-Protein (Kurzform für rifampicinbindendes Protein) bezeichnet.

Ob der Piperazinyl-iminomethyl-Rest oder das Rifamycin-Gerüst für die Bindung verantwortlich ist, kann aufgrund dieser Versuche allerdings noch nicht entschieden werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das rb-Protein in reiner Form zu isolieren und die wichtigsten molekularen Eigenschaften festzustellen. Außerdem sollte auch die Frage nach der Lokalisation des rb-Proteins in der Bakterienzelle beantwortet werden, da die Lokalisation eines Proteins oft einen Hinweis auf seine Funktion gibt.

Material

RNA-Polymerase aus E.coli wurde freundlicherweise von Frl.C.Leib und von Frau Dr.U.Lill zur Verfügung gestellt.

Für Zellhüll- und Membranpräparationen aus E.coli CR 34 danke ich M.Tropschug.

E.coli B (Wildtyp) wurde von Herrn Dr.Schmieger, Genetisches Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt.

Proinsulin aus Rinderpankreas wurde von Dr.Harding, Hormonchemie, München, zur Verfügung gestellt.

Enzyme und Eichproteine:

Rinderserumalbumin	Behring-Werke, Marburg
α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas	Serva, Heidelberg
Alkoholdehydrogenasen aus Hefe und Pferdeleber, Chymotrypsinogen A aus Rinderpankreas, Citratsynthase aus Schweineherz, Creatinkinase aus Kaninchenmuskel, Cytochrom c aus Pferdeherz, Desoxyribonuclease I aus Rinderpankreas, katalase aus Rinderleber, Lysozym aus Hühnereisweiß, Ovalbumin, Triosephosphatisomerase aus Kaninchenmuskel und Trypsininhibitor aus Sojabohne	Boehringer, Mannheim

Rifamycine:

Rifamycin SV, Rifampicin, N-Demethylrifampicin und [^3H]Rifampicin waren Geschenke der Gruppo Lepetit, Mailand, Italien.

Für Nährmedien:

Bacto Nutrient Broth, Bacto Yeast Extrakt und Bacto-Agar
Difco Laboratories Detroit, Michigan, USA

Für Elektrophoresen:

Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, Cellogelstreifen und Cello- gelblöcke, Amidoschwarz 10B und Coomassie Brilliant Blue G-250
Serva, Heidelberg

3-Dimethylaminopropionitril	Merck-Schuchardt, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
"membrane cones" 2100 CF 50 und	
"conical support" CS 1A	Amicon Corp., Lexington, Mass. 02173, USA

Für Radioaktivitätsmessung:

Dimethyl-POPOP, PPO	
Unisolve I	Koch & Light Laboratories Ltd., England
Naphtalin für Szintillationsmessung	Merck, Darmstadt

Sonstiges:

Na-Desoxycholat für die Mikrobiologie, Ascorbinsäure krist., Aktivkohle p.A., Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA), Harnstoff für biochemische Zwecke, Saccharose für Dichtegradientenzentrifugation	Merck, Darmstadt
Äthanolamin zur Synthese	Merck-Schuchardt, München
Dithioerythrol (DTE), N-Acetyl-DL-Phenylalanin-2-Naphtylester	Sigma Chemie, München
2-Mercaptoäthanol und Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Polyäthylenglykol (Typ 20 000)	Roth, Karlsruhe
Sephadex 4B (CNBr-aktiviert), Sephadex G-25 (coarse), Sephadex G-100 und Sephadex G-200 (superfine)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Dialysierschlauch Visking 20/32 und 36/32	Serva, Heidelberg
Whatman-3 MM-Chromatographiepapier	Hormuth & Vetter, Wiesloch, Baden

Alle übrigen Substanzen waren vom besten käuflichen Reinheitsgrad.

Alle Lösungen wurden unter Verwendung von bidestilliertem Wasser hergestellt.

Methoden

1. Bakterienstämme

Es fanden Verwendung: E.coli B M 1175 (rpoB-Mutante)
E.coli B 1175 (Wildstamm)
E.coli B (Wildstamm)

Die Isolierung des rb-Proteins durch Harnstoffelution und spezifische Desorption mit Rifampicin erfolgte aus E.coli B M 1175 (rpoB-Mutante), einem Stamm der Fa. Merck mit rifampicinresistenter RNA-Polymerase. Der Stamm wurde, auf Agar (0.5g NaCl, 1.5g Bacto-Nutrient-Broth und 2.0g Bacto-Agar in 100ml und 100µg Rifampicin pro ml) in Schrägröhrchen ausgestrichen, bei 4°C oder in Glycerinsuspension (1.8ml Übernachtskultur mit 0.5g NaCl, 1.5g Bacto-Nutrient-Broth in 100ml und 100µg Rifampicin/ml + 0.2ml Glycerin) bei -20°C aufbewahrt. Zellen der Agarkultur wurden zur Anzucht im großen Maßstab (vgl. 2.1.), die Glycerinsuspension zur Anzucht für den osmotischen Schock und die Messung der Rifampicinaufnahme verwandt.

Als Wildstämme fanden E.coli B 1175 (Zellen aus Anzucht der Fa. Merck; bei -20°C aufbewahrt) und E.coli B (in Glycerinsuspension von Dr. Schmieger, Genetisches Institut der Universität München zur Verfügung gestellt) Verwendung.

Zum Animpfen von Vorkulturen dienen eine Impföse (Agarkulturen) bzw. 0.1ml Glycerinsuspension.

2. Anzucht von Bakterien

2.1. Anzucht zur Isolierung von rb-Protein

Die Anzucht von E.coli B M 1175 (rpoB-Mutante) erfolgte im Medium nach C.C. Richardson et al. (1964) mit 1.1% K_2HPO_4 , 0.85% KH_2PO_4 , 0.6% Difco-Hefeextrakt und 1% Glucose bei 37°C unter Belüftung. 50 l Medium wurden mit 1l Zellen einer Übernachtskultur angeimpft. Das Wachstum wurde zum Ende der exponentiellen Phase ($ca. 9 \cdot 10^8$ Zellen/ml) durch Zugabe von Eis gestoppt. Die Zellen wurden bei 30 000 Upm (Padberg-Zentrifuge) abzentrifugiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Ausbeute betrug etwa 160g (Feuchtgewicht).

2.2. Anzucht exponentieller Zellen für osmotischen Schock und Messung der Rifampicinaufnahme

Die Anzucht exponentieller Zellen erfolgte im Medium wie oben, jedoch diente 1% Glycerin anstelle von Glucose als Kohlenstoffquelle. 1l Medium in Fernbachkolben wurde mit 10ml Zellen einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 130 UpM im Schüttelinkubator bebrütet (Wachstumsgeschwindigkeit: 2 Generationen/h). Bei einer Zelldichte von $2-3 \cdot 10^8$ Zellen/ml ($E_{660} = 0.045$ in Verdünnung 1:10) erfolgte die Induktion von β -Galaktosidase durch Zugabe von 5ml 0.1M Laktoselösung. Nach 30min (ca. $5 \cdot 10^8$ Zellen/ml bzw. $E_{660} = 0.08$ in Verdünnung 1:10) wurde das Wachstum durch rasches Abkühlen der Suspension im Eisbad gestoppt. Die Zellen wurden sofort weiterverarbeitet.

2.3. Anzucht stationärer Zellen

Um Zellen im stationären Wachstumsstadium zu erhalten, wurde ein Teil der exponentiellen Kultur (vgl. 2.2.) unter gleichen Bedingungen weiter gezüchtet bis die Extinktion der Suspension konstant blieb (10-12h; $E_{660} = 0.25$ in Verdünnung 1:10).

3. Affinitätschromatographie

3.1. Herstellung von N-Demethylrifampicin-Sepharose

Das Derivat N-Demethylrifampicin (vgl. Abb. 30) ermöglicht die kovalente Bindung des Rifampicin-Grundkörpers an CNBr-aktivierte Sepharose über die endständige, sekundäre Aminogruppe, wobei hauptsächlich ein Isoharnstoffderivat entsteht.

1g CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde in 50ml 10^{-3} M HCl gequollen (5min) und anschließend auf einer Filternutsche mit 150ml 10^{-3} M HCl (15min), dann mit 50ml Bindungspuffer (0.1M NaHCO_3 , 1M NaCl) gewaschen. Das Gel wurde in 5ml Bindungspuffer suspendiert und nach Zugabe von 10mg N-Demethylrifampicin, welches zunächst mit 0.1ml absolutem Äthanol angelöst und nach 15min durch Zugabe von 2ml Bindungspuffer klar gelöst worden war, 2h im Dunkeln bei

Raumtemperatur geschüttelt (280 UpM, Mini-Shaker B.Braun Mel-sungen AG). Nach dem Waschen mit 50ml Bindungspuffer war die Blockierung noch reaktiver Iminocarbonatgruppen der CNBr-Sepharose durch Schütteln in 10ml 1M Äthanolamin-HCl-Lösung (pH 8; 2h bei Raumtemperatur und 280 UpM) notwendig. Im Anschluß hieran wurde das Gel im Wechsel mit insgesamt 50ml Bindungspuffer und 50ml Acetatpuffer (0.1M, pH 4) mit 1M NaCl gewaschen und in Puffer A (vgl.3.2.) suspendiert. Aus 1g CNBr-Sepharose konnten 3ml Rifam-picin-Sepharose erhalten werden, die in einer Säule ($\phi = 12\text{mm}$) eine Gelbetthöhe von 25mm ergaben. Nach dem Äquilibrieren mit dem 20fachen Gelvolumen Puffer A war das Gel zur Benutzung bereit. Es wurde, soweit möglich, während der Herstellung und der Affini-tätschromatographie vor Lichteinwirkung geschützt, um Oxidation des Liganden zu verhindern.

Da aufgrund der während der Herstellung des Gels erhaltenen, weit-genend farblosen Filtrate das angebotene Antibiotikum nahezu vollständig gebunden sein mußte, kann von einer anfänglichen Kon-zentration von etwa 3mg Rifampicin/ml Gelvolumen ausgegangen werden, die jedoch im Laufe der Benutzung durch Auswaschen von Antibiotikum in gelöster oder an Sepharose-Partikel gebundener Form beträchtlich reduziert wurde.

3.2. Aufstellung der angewandten Tris-Puffer

Sämtliche, im folgenden aufgeführte Puffer enthalten 0.01M Tris-HCl (Ausnahme Puffer D mit 0.02M Tris-HCl), pH 7.9 bei 25°C.

Zusätzlich enthalten

Puffer A: 1 M KCl, 0.10mM EDTA, 0.1mM DTE, 0.02% NaN_3
5% (v/v) Glycerin

Puffer B: 0.3 M KCl, 0.10mM EDTA, 0.1mM DTE, 0.02% NaN_3

Puffer C: 0.15M KCl, 0.05mM EDTA, 0.5mM DTE, 0.01% NaN_3

Puffer D: 0.30M KCl, 0.10mM EDTA, 1 mM DTE, 0.02% NaN_3

Puffer E: 0.30M KCl, 0.05mM EDTA, 0.5mM DTE, 0.01% NaN_3

Puffer F: 0.15M KCl, 0.05mM EDTA, 0.1mM DTE, 0.01% NaN_3

3.3. Isolierung von rb-Protein durch Harnstoffelution

12.5g E.coli B M 1175 (Feuchtgewicht; Anzucht vgl.2.1.) wurden in 25ml Puffer (0.05M Tris-HCl pH 7.5 bei 25°C, 0.2M KCl, 0.01M MgCl₂, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTE, 5% (v/v) Glycerin) suspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier B-12, Stellung 3, 30-40 Skalenteile, 20min), wobei die Temperatur der Suspension durch Kühlung in Eis-Kochsalz-Mischung unter 8°C gehalten wurde. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Desoxyribonuclease I mit 1mg Desoxyribonuclease I/100ml Suspension (45min unter Rühren bei 4°C). Die folgende Ultrazentrifugation (Beckman-Zentrifuge L5-65, Rotor 42, 2h bei 31 500 UpM und 4°C) ergab ca. 30ml leicht getrübbten Überstand, der bis zu 40% Sättigung mit Ammoniumsulfat versehen wurde (23.1g/100ml unter Rühren bei 4°C innerhalb 1h). Mit 1M NaOH wurde der pH-Wert bei 7.5 gehalten. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, SS34, 30min bei 10 500 UpM und 4°C) und verworfen, und der hellgelbe Überstand (ca.35ml) insgesamt 8h gegen 3x1l Puffer A dialysiert.

Das Dialysat (ca. 10mg Protein/ml) wurde über Nacht auf eine Rifampicin-Sepharose-Säule (Ø = 12mm) mit 6ml Gelvolumen aufgetragen (Durchlaufgeschwindigkeit 5ml/h). Das Nachwaschen (20ml/h) erfolgte mit dem 50fachen Säulenvolumen Puffer A und anschließend mit dem gleichen Volumen Puffer B, die darauffolgende Elution zunächst mit dem 5fachen Säulenvolumen Puffer B mit 3M Harnstoff, dann zusätzlich mit 1 Säulenvolumen Puffer B mit 6M Harnstoff (15ml/h). Die vereinigten Harnstoffeluate (ca.40ml) wurden gegen 3x1l Veronalpuffer (50mM Na-Veronal, 10mM Veronal, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTE, 0.02% NaN₃, pH 8.8) dialysiert (24h) und im gleichen Puffer in Gegenwart von 20% (w/v) Polyäthylenglykol (Typ 20 000) auf 1% des ursprünglichen Volumens bis zu einer Proteinkonzentration von etwa 10mg/ml eingengt. Zur Vorbereitung auf die anschließende Reinigung durch Cello-gelblock-Elektrophorese (vgl.4.) erfolgte abschließend Dialyse gegen Veronalpuffer mit 10% (v/v) Glycerin.

3.4. Isolierung von rb-Protein durch spezifische Elution

25g E.coli B M 1175 (rpoB-Mutante) (Feuchtgewicht; Anzucht vgl.2.1.) wurden in 70ml Puffer A suspendiert und 20min lang durch Ultraschall aufgeschlossen (vgl.3.3.). Die Zentrifugation (Sorvall, SS34, 20 000 UpM, 1h bei 4°C) ergab 80ml leicht trüben Überstand, der gegen 2x1l Puffer A dialysiert wurde. Das Dialysat wurde auf eine Rifampicin-Sepharose-Säule ($\emptyset = 12\text{mm}$) mit 12ml Gelvolumen über Nacht aufgetragen (5ml/h). Es wurde mit dem 20fachen Säulenvolumen Puffer A und dem gleichen Volumen Puffer B nachgewaschen (20ml/h) und anschließend mit einem Rifampicingradienten (45ml; 0.1-1.5mg Rifampicin/ml Puffer A) eluiert (15ml/h). Nach erneutem Waschen mit dem doppelten Gelvolumen Puffer A wurde mit dem entsprechenden Volumen Puffer B mit 6M Harnstoff nochmals eluiert (je 15ml/h). Rifampicin- und Harnstoffeluat wurden in Fraktionen à 40 Tropfen (= 1.9ml) aufgefangen. Die vereinigten Fraktionen der Rifampicin-elution wurden in Gegenwart von 20% (w/v) Polyäthylenglykol (Typ 20 000) auf 2% des ursprünglichen Volumens eingengt und zur Entfernung von restlichem Rifampicin 5 Tage lang gegen 3x1l Puffer B mit Aktivkohle (0.5g/l) dialysiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

4. Cellogel-Elektrophoresen

4.1. Handhabung

Cellogel-Elektrophoresen wurden analytisch auf Cellogelstreifen (50 x 240 x 0.3mm, Serva), präparativ auf Cellogelblöcken (60 x 170 x 2.5mm, Serva) an einem auf 0°C vorgekühlten Phorographen nach Wieland-Pfleiderer (Hormuth & Vetter, Heidelberg-Wiesloch) durchgeführt. Die Verbindung vom Gel zu den Pufferkammern erfolgte unter Verwendung mehrfach gefalteter, mit Puffer getränkter Leinentücher, die zum Schutz gegen Verdunstung in Kunststoffolie eingeschlagen und zur besseren Kontaktnahme mit einer Glasplatte auf die Gelenden aufgepreßt wurden. Das Gelmaterial wurde in Methanol-H₂O (1:1) aufbewahrt und vor Gebrauch 45min in 200ml Elektrophoresepuffer (Streifen) bzw. über Nacht und zusätzlich 4h vor Verwendung in je 200ml (Blöcke) gewaschen und gequollen. Elektrophoresepuffer: Veronalpuffer (vgl.3.3.)

4.2. Elektrophorese auf Cellogelelestriefen (analytisch)

Es wurden bis zu 10 μ l Proteinlösung (10mg Protein/ml) in einer Bandenbreite von 10mm in der Mitte eines Streifens aufgetragen. Lauf: 2h bei 700V und 5mA (0°C)

Die Streifen wurden 5min in einer Lösung von 0.24% Amidoschwarz 10B in 45% Methanol, 45% H₂O und 10% Eisessig (Heil and Zillig, 1970) angefärbt und zum Entfernen des überschüssigen Farbstoffs in reines Lösungsmittel gelegt.

4.3. Elektrophorese auf Cellogeleleblöcken zur Isolierung von rb-Protein (präparativ)

Auf einen Block wurden bis zu 1.2ml (= 12mg Protein) des eingengten, gegen Elektrophoresepuffer mit 10% Glycerin dialysierten Harnstoffeluats der Rifampicin-Sepharose (vgl.3.3.) portionsweise, mit Hilfe einer Hamiltonspritze, in einer schmalen Bande über eine Breite von 50mm und ca. 30mm von dem der Kathode zugewandten Rand des Gels entfernt aufgetragen.

Lauf: 8h bei 600V und 15mA unter Kühlung (-2°C bis -7°C)
Gegen Ende der Elektrophorese wurde zur Lokalisation der rb-Protein-Bande mit einem Papierstreifen (20mm breit; Whatman 3MM) ein Abklatsch aus der Mitte des Gelblocks angefertigt (Anfärbung vgl.4.2.). Dem Abdruck entsprechend wurde mit einer Rasierklinge der Gelstreifen mit der Bande des rb-Proteins ausgeschnitten und in kleinen Stücken durch Zentrifugieren (Sorvall, SS34, 19 000 UpM, 5min) in in Puffer gequollenen "membrane cones" (Amicon Corp., U.S.A.), deren Spitze abgeschnitten worden war, ausgepreßt (Abb.1).

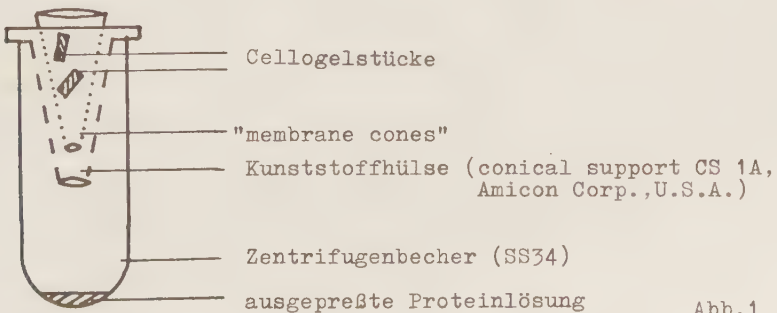


Abb.1

Aus einem Gelstreifen von 10mm Breite konnte etwa 1ml Proteinlösung gewonnen werden. Zur Verbesserung der Ausbeute wurden die trocken zentrifugierten Gelstücke in 1ml Elektrophoresepuffer über Nacht wieder gequollen und nochmals zentrifugiert.

Die Untersuchung der gewonnenen Fraktionen erfolgte auf Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelen (vgl. 5.1.), deren planimetrische Auswertung bei Bezug auf die in der Cello-gel-Elektrophorese eingesetzte Menge an rb-Protein eine Abschätzung der Ausbeute ermöglichte.

Die durch mehrere präparative Elektrophoresen gewonnenen rb-Protein-Lösungen wurden vereinigt, in einen Dialysierschlauch (Visking 20/32) gefüllt und zum Einengen bis zur Füllhöhe in Sephadex G-25 (coarse, ungequollen) eingebettet. Nach 4-5 Tagen (4°C) war bei Ausgangsvolumina bis zu 30ml eine 10fache Konzentrierung erreicht. Abschließend erfolgte Dialyse gegen Puffer B.

5. Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

5.1. Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Rundgele

Die Elektrophoresen erfolgten nach Shapiro et al. (1967), modifiziert nach Burgess (1969).

Zusammensetzung der Gele: 0.1M Na-Phosphat pH 7.2

0.1% Na-Dodecylsulfat

10% Acrylamid

(Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid
= 30:0.8)

Die Polymerisation erfolgte in Gegenwart von 0.12% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 0.4% (v/v) Dimethylaminopropionitril und 0.0075% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen mindestens 1:1 mit Probenpuffer (0.01M Na-Phosphat pH 7.2, 0.2% Dodecylsulfat, 10% (w/v) Glycerin, 3% (v/v) 2-Mercaptoäthanol) verdünnt und 1/2h bei 37°C inkubiert, falls nicht anders angegeben.

Elektrophorese: 4h bei 30V und 8mA/Gel bei Raumtemperatur in 0.1M Na-Phosphat pH 7.2 mit 0.1% Dodecylsulfat

Molekulargewichtsbestimmungen in Gegenwart von Dodecylsulfat wurden in obigem System nach Shapiro et al. (1967), Dunker und Rueckert (1969) und Weber und Osborn (1969) durchgeführt. Die relativen Beweglichkeiten aller Proteinbanden wurden auf diejenige des Eichproteins Lysozym (= 100%) bezogen.

5.2. Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Plattengele

Die Elektrophoresen wurden in Anlehnung an Laemmli (1970) in einer Apparatur und nach Angaben der Fa.Hölzel (Dorfen, Obb.) durchgeführt. Jedoch wurden Gele mit konstanter Acrylamidkonzentration benutzt, da diese im Bereich der rb-Protein-Bande eine bessere Trennung als Gele mit linearem oder exponentiellem Acrylamidgradienten ergaben.

Trenngel:	0.375M	Tris-HCl pH 8.8
	0.1%	Na-Dodecylsulfat
	15%	Acrylamid
		(Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid = 30:0.8)
	0.03%	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
	0.0025%(v/v)	TEMED
Sammelgel:	0.124M	Tris-HCl pH 6.8
	0.1%	Na-Dodecylsulfat
	3%	Acrylamid (vgl.Trenngel)
	0.06%	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
	0.05%	(v/v) TEMED

Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer (100 Teile 0.065M Tris-HCl pH 6.8 mit 3% Dodecylsulfat und 5% (v/v) 2-Mercaptoäthanol + 10 Teile Glycerin + 10 Teile 0.01%ige Bromphenolblau-Lösung) bis zu einer Endkonzentration von mindestens 1% Dodecylsulfat und 2% 2-Mercaptoäthanol versetzt und 5min bei 100°C inkubiert. Lösungen mit sehr geringem Proteingehalt wurden konzentriert, indem aus geeigneten Volumina je nach Proteingehalt das Protein ausgefällt (vgl.6.) und in 90µl Probenpuffer + 10µl 1M NaOH zur Neutralisierung restlicher Trichloressigsäure wieder gelöst wurde. Die Inkubation erfolgte wie oben. Ganze Zellen wurden für die Elektrophorese in einer Konzentration von 30mg Feuchtge-

wicht/ml in Probenpuffer gelöst und 15min bei 100°C inkubiert.
Es wurden Proben von höchstens 20µl aufgetragen.

Elektrophorese: 30min bei 100V und 12mA (Raumtemperatur), dann
5-6h bei 250V und 20-25mA (4°C) in Puffer mit
0.025M Tris, 0.192M Glycin und 0.1% Dodecylsulfat
(Wanderungsstrecke der Bromphenolblau-Bande im
Trenngel = 80mm)

Die Trocknung der Gele erfolgte nach Vorschrift der Fa.Hölzel.

5.3. Discgel-Elektrophorese

Es wurde das Gelsystem Nr.1 nach Maurer (1971) benutzt, jedoch wurde eine 8fach konzentrierte $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ -Lösung benutzt; die fehlenden Volumenteile in der Trenngelmischung wurden durch H_2O ersetzt. Anstelle von Saccharoselösung (Lösung Nr.7) fand eine Mischung von Glycerin/ H_2O (1:4, v/v) Verwendung. Die Herstellung von Gelen verschiedener Acrylamidkonzentration im Trenngel erfolgte durch entsprechende Variation des Volumenverhältnisses von Acrylamidlösung zu H_2O . Die Polymerisation des Sammelgels erfolgte durch Bestrahlen mit einer Glühbirne (150W, 1h).

Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen mindestens 1:1 mit Probenpuffer (1ml Sammelgelpuffer, 1ml Glycerin, 7ml H_2O , 0.5ml 0.01%ige Bromphenolblau-Lösung) verdünnt.

Elektrophorese: 30min bei 30V und 0.5mA/Gel, anschließend
2-3h bei 120V und 2.5mA/Gel in Puffer von 0°C

Die Gele wurden an der Bromphenolblau-Bande mit einer Rasierklinge abgeschnitten.

Molekulargewichtsbestimmungen in diesem System erfolgten nach Hedrick und Smith (1968). In Gelen mit 3.75%, 5.625%, 7.5%, 9.375% und 11.25% Acrylamid wurden die relativen Beweglichkeiten der Proteinbanden bezüglich der Bromphenolblau-Bande bestimmt und in Abhängigkeit von der Acrylamidkonzentration aufgezeichnet. Die Steigungen der für jedes Protein erhaltenen Geraden ergeben, in Abhängigkeit vom Molekulargewicht aufgetragen, die Eichgerade, aus der die gesuchte Größe abgelesen werden kann.

5.4. Normalgel-Elektrophorese

Es wurden Gele mit 7.5% Acrylamid verwandt. Herstellung und Durchführung der Elektrophorese vgl.H.Lill (1973).

5.5. Auswertung der Gele

Das Anfärben der Gele erfolgte in allen Fällen in einer Lösung von 0.05% Coomassie Brilliant Blue G 250 in Methanol:Eisessig:H₂O = 5:1:5, das Entfärben in 7.5% Methanol, 5% Eisessig, bei Rundgelen zusätzlich elektrophoretisch 6h bei 150mA.

Densitometrische Aufzeichnungen wurden an einem Microdensitometer 3 CS (Joyce-Loebl) vorgenommen (Filter 550nm, Graufilter 1.5D; Spalteinstellung: Weite = 40 Skalenteile, Höhe = 5 Skalenteile). Je nach Intensität der Proteinbanden wurden Graukeile mit optischen Dichten von 0.38-2.39D verwandt. Das Übersetzungsverhältnis zwischen Proben- und Registrierschlitten betrug 1:2 oder 1:4. Die planimetrische Auswertung der Aufzeichnungen erfolgte nach H.Lill (1973) durch Übertragen der Banden auf Transparentpapier und Auswiegen auf der Analysenwaage.

6. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode von Lowry et al. (1951) wie bei Jaenicke (1966) beschrieben, modifiziert nach Bensadoun und Weinstein (1976). Anstatt aus 3ml wurde jedoch zu bestimmendes Protein aus 1.2ml Lösung durch Zugabe von 10µl 2%iger Na-Desoxycholat-Lösung und 400µl 24%iger Trichloressigsäure ausgefällt. Anschließend wurden die Proben 30min zentrifugiert (Heraeus-Christ, Labofuge II, 3 500 UpM), der Überstand mit Hilfe einer Pasteurpipette über die Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt, und der Niederschlag in Cu-Tartrat-Lösung gelöst. Die Eichkurve wurde mit in gleicher Weise behandelten Proben einer Rinderserumalbumin-Lösung aufgestellt.

Bei Bestimmungen der Proteinkonzentration von in Gegenwart von Polyäthylenglykol eingeengten Proteinlösungen wurde gleichzeitig mit dem Auftreten des blauen Farbstoffkomplexes die Bildung eines feinen, gelben Niederschlags beobachtet, der die Extinktions-

messung störte. Es könnte sich dabei um Polywolfram- oder Polymolybdänsäure handeln, die sich aus dem Reagenzgemisch abscheiden. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlags zeigten die Extinktionswerte des Überstands für Parallelproben mit gleicher Proteinmenge eine ungewöhnlich hohe Schwankungsbreite. Da Bestimmungen in nicht mit Polyäthylenglykol eingeengten Proteinlösungen problemlos waren, ist die Störung wohl darauf zurückzuführen, daß beim Einengen der Proteinlösung in Gegenwart des Polymeren kleine Mengen niedermolekularer Bestandteile in das Dialysat gelangten, die auch durch mehrfache Dialyse gegen Puffer ohne Polyäthylenglykol nicht wieder entfernt werden konnten.

Konzentrierung von Proteinproben für die Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese:

Die oben beschriebene Proteinfällung wurde auch zur Konzentrierung von Proteinlösungen benutzt. Je nach Konzentration der Proteinlösung wurde enthaltenes Protein aus 1.2ml (vgl.oben) oder aus 3ml mit entsprechend größeren Volumina an Na-Desoxycholat- und Trichloressigsäurelösung (Zentrifugation: Sorvall, SS34, 30min bei 5 500 Upm) ausgefällt. Der erhaltene Niederschlag wurde in insgesamt 100µl dodecylsulfathaltigem Puffer gelöst (vgl.5.2.). Auf diese Weise konnte eine bis zu 30fache und, bei Wiederholung des Fällungsvorgangs aus ebenso großem Volumen in demselben Glas, bis zu 60fache Konzentrierung von Proben erreicht werden.

7. Dünnschichtchromatographie

Es wurde nach der Vorschrift für das Biochemische Praktikum mit einer Apparatur der Fa.Boehringer Mannheim gearbeitet. Die Versuche wurden auf Sephadex G-200 (superfine) in 0.2M Na-Phosphatpuffer pH 6.6 durchgeführt. Für den Kontrollversuch in Anwesenheit von SH-Schutzreagenz enthielten Puffer und Proteinlösungen 10mM 2-Mercaptoäthanol. Eichproteine wurden in einer Konzentration von 10mg/ml in diesem Puffer gelöst und jeweils im Verhältnis 1:1 mit Cytochrom c - Lösung gemischt. 2 Volumenteile der vorliegenden rb-Protein-Lösung (5.7mg/ml in Puffer B) wurden mit 1 Volumenteil Cytochrom c - Lösung gemischt. Mit einer Eppendorfpipette wurden je 5µl der Eichproteinmischungen und 10µl der rb-Protein-Mischung

einzelnen punktförmig auf die Gelschicht aufgetragen und absteigend chromatographiert (2-3h). Nach Andrews (1965) und Determann und Michel (1966) sind bei Chromatographie an Sephadex-Gelen die R_F -Werte von Proteinen proportional zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte, was zur Erstellung einer Eichgeraden benutzt wird. Zur Bestimmung der R_F -Werte wurden die Wanderungsstrecken der Proteine auf einem Papierabklatsch, angefärbt mit Amidoschwarz (vgl. 4.2.) vermessen und durch diejenige des Cytochrom c (R_F -Wert = 1) dividiert.

8. Zentrifugation im Sucroседichtegradienten

Praktische Durchführung und Auswertung erfolgten in Anlehnung an Martin und Ames (1961). Die Zentrifugationen wurden in einer Beckman-Ultrazentrifuge L5-65 im Rotor SW 56 durchgeführt (21h bei 45 000 Upm und 4°C). Ein Gradient bestand aus 4ml 20-5%iger (w/v) Sucroселösung in Puffer C und wurde im Anschluß an die Zentrifugation mit Hilfe einer Gradientenaustropfvorrichtung (Beckman) in 35-40 Fraktionen à 2 Tropfen aufgefangen.

Für Zentrifugationen in Anwesenheit von Rifampicin enthielt die Gradientenlösung das Antibiotikum in den jeweils angegebenen Konzentrationen. Die Lösungen des rb-Proteins wurden vor Zugabe der Eichproteine in Gegenwart entsprechender Rifampicinkonzentrationen inkubiert (6h bei 25°C).

Das Volumen der auf den Gradienten aufgetragenen Proteinmischungen betrug jeweils 150µl. Die Lage der Proteingipfel im Gradienten wurde durch planimetrische Auswertung von Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelen (vgl. 5.1.) der Fraktionen bestimmt.

9. Photospektrometrische Konzentrationsbestimmung von Rifampicin- und [³H]Rifampicinlösungen

Die Konzentrationsbestimmungen von Rifampicinlösungen erfolgten nach Maggi et al. (1966) durch Messung der Extinktion bei 475nm im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II, die dem im reduzierten Zustand des Rifampicins vorliegenden Hydrochinonsystem zuzuschreiben ist. Hierzu wurden geeignete Verdünnungen (ca. $1 \cdot 10^{-5}M$) der vorliegenden wässrigen Lösungen in 0.01M Na-Phosphatpuffer (pH 7.4) herge-

stellt. Die Extinktion ($E_{475} = 0.1-0.2$) wurde in Quarzküvetten ($d = 10\text{mm}$) gegen eine Vergleichsküvette mit Puffer gemessen, und die genaue Konzentration mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 1.54 \cdot 10^4 \text{cm}^2 \text{mmol}^{-1}$, Maggi et al., 1966) über die Lambert-Beer'sche Beziehung berechnet. Vergleiche mit den aufgrund der Einwaage berechneten Konzentrationen ergaben Abweichungen von 5% für Rifampicin und von 10% für $[^3\text{H}]$ Rifampicin. Messungen nach Zusatz von reduzierenden bzw. die Oxidation verhindernden Substanzen wie Ascorbinsäure (10mM) oder DTE (10mM) zu Rifampicinlösungen und Vergleichspuffer ergaben gleiche Werte. Die Substanzen lagen damit in mindestens 95%iger bzw. 90%iger Reinheit im reduzierten Zustand vor.

Um Fehler aufgrund der Adsorption von Rifampicin an Glasoberflächen (vgl. Wyss and Wehrli, 1976) möglichst zu vermeiden, wurden Verdünnungen direkt in den zur Messung bestimmten Küvetten vorgenommen, und grundsätzlich die zur Entnahme einer Probe bestimmte Pipette zuvor mehrmals mit der zu entnehmenden Lösung gespült.

10. Radioaktivitätsmessung

Die Radioaktivitätsmessung für die Gleichgewichtsdialyse mit renaturiertem rb-Protein erfolgte in Dioxan-Zählflüssigkeit nach Thiebe und Zachau (1965), einer Lösung von 250mg Dimethyl-POPOP, 10g PPO und 120g Naphtalin in 1l Dioxan. 100 μ l der zu messenden Probe bzw. die mit H_2O auf 100 μ l ergänzte Probe wurde mit 10ml Zählflüssigkeit vermischt und im Isocap 300 (Nuclear Chicago Division) gezählt. Die Zählzeit betrug 10min pro Probe, nachdem diese mindestens 2h im Gerät vorgekühlt worden war, und auftretende Chemilumineszenz weitgehend abgeklungen war. Als Blindwert diente eine Mischung von 100 μ l H_2O und 10ml Zählflüssigkeit. Die sich für diese Mischung ergebende Impulszahl (50-70 IpM) wurde als Untergrund von derjenigen der Proben subtrahiert.

Für die Radioaktivitätsmessung bei Gleichgewichtsdialysen mit dem durch Rifampicin eluierten rb-Protein und bei den Rifampicinbindungsversuchen mit ganzen Zellen wurden 10ml Unisolve I (Koch & Light Laboratories) mit 1ml H_2O und 3-20 μ l Probe im Zählgläschen gemischt und nach 2stündiger Vorkühlung 10min gezählt (Mark II, Nuclear Chicago Division). Der Blindwert einer Mischung aus 10ml Unisolve + 1ml H_2O (15-20 IpM) wurde von den Meßwerten der Proben subtrahiert.

11. Spezifische Radioaktivität von [^3H] Rifampicin und Aufbewahrung der Lösungen

Zur Ermittlung der spezifischen Radioaktivität wurde in 4 verschiedenen Volumina (5-100 μl) der verdünnten [^3H] Rifampicinlösung, deren Konzentration, wie in Kap.9. beschrieben, ermittelt worden war, die Radioaktivität gemessen. Mit der bekannten molaren Konzentration konnte für Radioaktivitätsmessungen in Dioxan-Zählflüssigkeit eine mittlere spezifische Radioaktivität von 9 700 IpM/nmol und für Messungen in Unisolve I von 8 630 IpM/nmol berechnet werden.

Wässrige [^3H] Rifampicinlösungen konnten über einen Zeitraum von 2-3 Wochen bei 4°C und vor Lichteinwirkung geschützt aufbewahrt werden, ohne daß eine wesentliche Änderung der spezifischen Radioaktivität festzustellen war. Nach längerer Lagerung (mehr als 2 Monate) bei -20°C war eine Abnahme der Radioaktivität in der Lösung festzustellen.

12. Gleichgewichtsdialysen

12.1. Durchführung

Gleichgewichtsdialysen wurden in einer von Englund et al. (1969) beschriebenen Mikroapparatur (Näheres vgl. Neudecker, 1970) durchgeführt, die aus zwei durch eine Membran getrennten Dialysekammern mit je 30 μl Rauminhalt besteht. Als Membranen dienten 100 mm^2 große Stücke aus Dialysierschlauch (Visking 20/32), die nach Englund et al. (1969) vorbehandelt und gelagert wurden. Zum Füllen der Kammern und zur Probenentnahme dienten Hamiltonspritzen mit 25 μl bzw. 5 μl Volumen. Die Dialysekammer A wurde mit 20 μl wässriger [^3H] Rifampicinlösung, die Kammer B mit 20 μl Proteinlösung der angegebenen Konzentrationen in Puffer D gefüllt. Nach Verschuß der zum Füllen der Kammern bestimmten Bohrungen mit Klebestreifen wurde das Dialysesystem bis zur Gleichgewichtseinstellung in einem Wasserbad von 25°C gedreht (12 UpM). Zur besseren Durchmischung des Kammerinhalts enthielt jede Kammer eine Glasperle ($\varnothing = 1\text{mm}$). Nach erfolgter Gleichgewichtseinstellung (10h, vgl. 12.4.) wurden je 3 μl des Inhalts der Kammern A und B zur Messung der Radioaktivität (vgl. 10.) entnommen.

12.2. Auswertung der Meßergebnisse nach Scatchard (1949)

Besitzt ein Protein n identische, voneinander unabhängige Bindungsstellen für ein Substrat S , von denen jede das Substrat mit der Dissoziationskonstanten K_D bindet, so ist diese nach dem Massenwirkungsgesetz

$$K_D = \frac{[S] [\text{freie Bindungsstellen}]}{[\text{besetzte Bindungsstellen}]} = \frac{[c] [n-r]}{[r]} \quad (1)$$

mit $[c]$ = Konzentration des freien, nichtgebundenen Substrates

$[r]$ = Konzentration der besetzten Bindungsstellen

Nach Scatchard (1949) läßt sich die Gleichung wie folgt umformen:

$$\frac{r}{c} = - \frac{1}{K_D} (r - n)$$

Die Größen r und c werden aus Messungen der Konzentrationen an freiem und gebundenem Substrat im Gleichgewicht berechnet. Die Auftragung der aus Versuchen bei verschiedenen anfänglichen Substratkonzentrationen erhaltenen Ergebnisse ergibt unter der Voraussetzung, daß identische, voneinander unabhängige Bindungsstellen vorliegen (vgl. Weder et al., 1974) eine Gerade, deren extrapolierte Schnittpunkt mit der Abszisse direkt die Zahl n der Bindungsstellen angibt. Die Dissoziationskonstante K_D läßt sich aus der Geradensteigung berechnen ($\text{tg} \alpha = - \frac{1}{K_D}$) und ist ein Maß für die Affinität des Proteins zum Substrat.

Die in der kein Protein enthaltenden Dialysekammer befindliche Radioaktivitätsmenge (A) entspricht der Konzentration c des freien, nicht gebundenen Substrats, die in der mit Proteinlösung gefüllten kammer befindliche Menge (B) der Summe der Konzentrationen an freiem und vom Protein gebundenem Substrat. Die Größen r und c bzw. $\frac{r}{c}$ werden aus den Meßwerten A und B wie folgt berechnet:

$$c = \frac{\frac{1}{3} A}{R} \quad (\text{mM}) \quad \text{und} \quad r = \frac{\frac{1}{3} (B-A)}{R} : [P]$$

mit A, B = Radioaktivität in den Kammern A und B ($\text{IpM}/3\mu\text{l}$)
 R = spezifische Radioaktivität von $[^3\text{H}]$ Rifampicin (IpM/nmol) (vgl. 11.)
 $[P]$ = Proteinkonzentration in Kammer B (mM)

Die jeweiligen Regressionsgeraden sowie die zugehörigen Korrelationskoeffizienten k wurden numerisch auf der Grundlage der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt.

12.3. Ermittlung des bis zur Gleichgewichtseinstellung nötigen Dialysezeitraumes

Der bis zur Gleichgewichtseinstellung notwendige Dialysezeitraum wurde in einem Vorversuch ermittelt, bei dem die beiden Kammern A und B des Dialysesystems mit gleichen Volumina wässriger $[^3\text{H}]$ Rifampicinlösung bzw. Puffer D beschickt wurden. Zu verschiedenen Zeiten wurde die Radioaktivität in beiden Kammern bestimmt. Nach einer Dialysezeit von 7h war das Gleichgewicht eingestellt und im Rahmen der Meßgenauigkeit, die aufgrund der Messung von Parallelproben 2% betrug, keine Konzentrationsänderung mehr zu beobachten (Abb.2).

Die mindestens notwendige Dialysezeit beträgt also 7h.

12.4. Stabilität des rb-Proteins unter den Bedingungen der Gleichgewichtsdialyse

Voraussetzung für die Durchführung der Gleichgewichtsdialyse ist, daß das rb-Protein unter den gewählten Bedingungen stabil ist, und keine Denaturierungserscheinungen auftreten. In einem Vorversuch wurde die Gleichgewichtslage über einen Zeitraum bis zu 43h untersucht. Bei der ersten Probenentnahme nach 7h lag bereits ein Gleichgewicht vor, dessen Lage sich bis zu 17.5h nicht änderte, wie aus der nahezu konstant bleibenden Differenz der Radioaktivi-

tätskonzentrationen, die der Konzentration an proteingebundenem Rifampicin entspricht, hervorgeht. Die leichte Abnahme der Konzentration an gebundenem Rifampicin nach 32h und nach 43h spricht für eine allmählich abnehmende Bindungsfähigkeit des Proteins infolge einer Denaturierung bei 25°C (Abb.3).

Um einerseits zu gewährleisten, daß das Gleichgewicht auch bei anderen Konzentrationsverhältnissen zum Zeitpunkt der Probenentnahme erreicht ist, andererseits aber nicht die Gefahr einer Denaturierung einzugehen, wurde bei den Gleichgewichtsdialysen eine Dialysezeit von jeweils 10h gewählt.

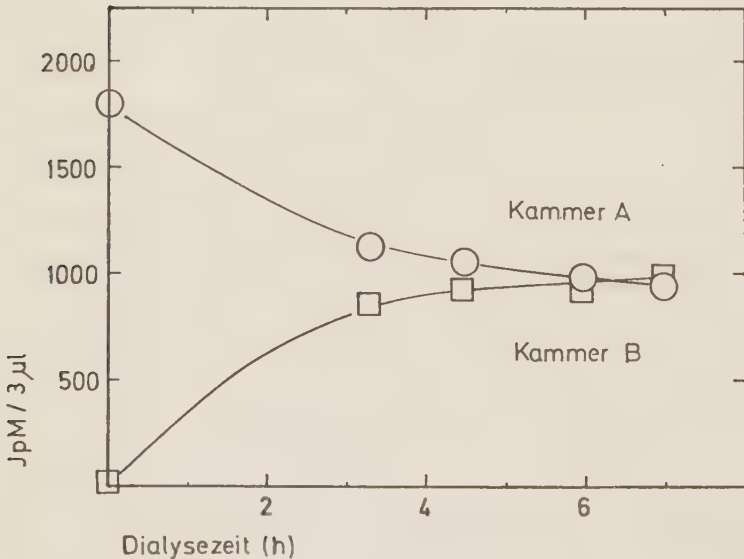


Abb.2

Bestimmung des zur Gleichgewichtseinstellung nötigen Dialysezeitraumes

Kammer A wurde mit 20µl einer wässrigen [^3H]Rifampicinlösung ($6.5 \cdot 10^{-5}\text{M} = 1\,890\text{ IpM}/3\mu\text{l}$), Kammer B mit 20µl Puffer D gefüllt. Durchführung der Dialyse vgl.12.1. Zu den bezeichneten Zeiten wurden je 3µl des Kammerinhalts entnommen und die Radioaktivitätskonzentration bestimmt (vgl.10.)

12.5. Zur Fehlerbreite bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die Bestimmung von Bindungs- und Dissoziationskonstanten nicht-kovalenter Protein-Liganden-Komplexe durch Messung der Konzentration des Komplexes in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration ist im allgemeinen einem relativ großen methodischen Fehler unterworfen. Dieser kann dadurch verringert werden, daß die Versuche bei einem Sättigungsanteil s der verdünnten Komponente von etwa $0.2 \leq s \leq 0.8$ durchgeführt werden (Deranleau, 1969). Die Ausgangskonzentrationen an Protein und Rifampicin wurden deshalb nach Möglichkeit so gewählt, daß, legt man das Protein als die verdünntere Komponente fest, im Gleichgewicht das Verhältnis der Konzentration an gebundenem Protein $[P-Rif]$ zur Gesamtprotein-

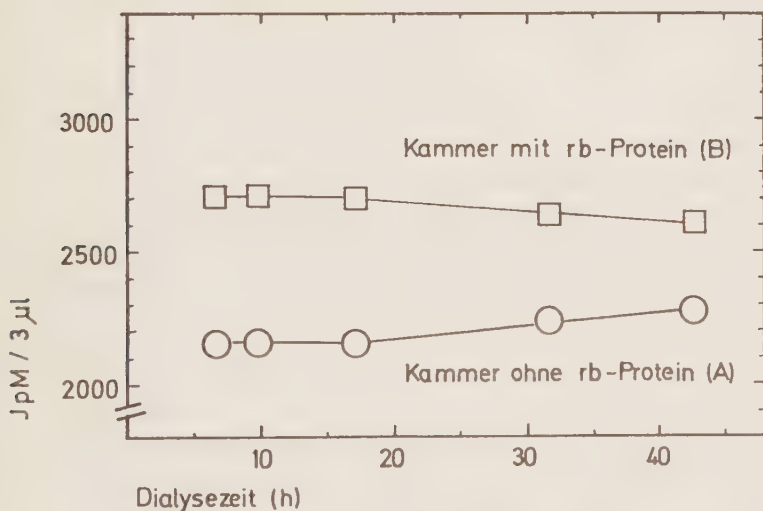


Abb.3

Änderung der Gleichgewichtslage in Abhängigkeit von der Dialysezeit

Kammer A wurde mit 20µl wässriger $[^3H]$ Rifampicinlösung ($1.7 \cdot 10^{-4} M = 4\ 880\ IpM/3\mu l$), Kammer B mit 20µl einer Lösung des renaturierten Proteins (vgl. Kap. I.1.; $2.33\ mg/ml$ in Puffer D = $66.6 \cdot 10^{-6} M$) gefüllt. Durchführung der Dialyse vgl. 12.1. Zu den bezeichneten Zeiten wurden je 3µl des Kammerninhalts entnommen und die Radioaktivitätskonzentration bestimmt (vgl. 10.).

konzentration $[P_t]$ $0.2 \leq s = \frac{[P-Rif]}{[P_t]} \leq 0.8$ betrug. Meßpunkte außerhalb dieses Bereiches erhielten bei der Berechnung der Regressionsgeraden (vgl. 12.2.) nur halbes Gewicht im Vergleich zu den innerhalb liegenden Punkten.

Außerdem ist es anhand der im Vorversuch ermittelten Genauigkeit für die Bestimmung der Radioaktivitätskonzentration in den Dialysekammern A und B möglich, den maximalen Fehler bei der Berechnung der Konzentration an proteingebundenem Rifampicin $[P-Rif]$ aus diesen Impulszahlen und damit überhaupt abzuschätzen. Bildet man aus den Meßwerten A und B ($B > A$), deren maximaler relativer Fehler ϵ_0 bekannt ist, die Differenz, so kann man den relativen Fehler ϵ der Differenz abschätzen nach

$$|\epsilon| \leq \frac{(A + B) \cdot \epsilon_0}{(B - A)} \quad (2)$$

Der relative Fehler ϵ_0 für die Messung von A und B im Vorversuch betrug 2% (vgl. 12.3.). Nach Gleichung (2) ist der maximale relative Fehler ϵ bei der Berechnung von $[P-Rif]$ also etwa 20%. Der Fehler hängt sowohl von Verhältnis und Größe der beiden Impulszahlen A und B als auch vom Fehler ϵ_0 ab, dessen Wert durch die absoluten Größen der gemessenen Radioaktivitätskonzentrationen beeinflusst wird. Deshalb ist zu erwarten, daß bei den folgenden Versuchen einerseits ϵ in Abhängigkeit von der Rifampicinkonzentration und dem vorliegenden Sättigungsgrad größer oder kleiner als 20% sein kann, andererseits sich aber solche Schwankungen bei Messungen über den genannten Sättigungsbereich ausgleichen. Da die Größen r und r/c für die Auftragung nach Scatchard aus der Konzentration des proteingebundenen Rifampicin $[P-Rif]$ berechnet werden (vgl. 12.2.), haben diese etwa den gleichen maximalen Fehler von 20%. Ein ähnlicher Fehler ist deshalb näherungsweise auch für die aus dem Scatchard-Diagramm entnommene Dissoziationskonstante und die Anzahl der Bindungsstellen anzunehmen.

12.6. Vorversuch mit RNA-Polymerase aus E.coli

Um einen Anhaltspunkt für die Größenordnung der Dissoziationskonstanten zu gewinnen, die unter den gegebenen Bedingungen, insbesondere unter Berücksichtigung der spezifischen Radioaktivität des $[^3\text{H}]$ Rifampicin, mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse erfaßt werden kann, wurden Vorversuche mit RNA-Polymerase aus E.coli (Rumpfenzym) und $[^3\text{H}]$ Rifampicin durchgeführt. Dieses Enzym bindet nach kinetischen Untersuchungen Rifampicin mit einer Dissoziationskonstanten $K_D = 3.3 \cdot 10^{-9}\text{M}$ (37°C) im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 (Wehrli et al., 1968). Aus den durch Messungen im Dialysegleichgewicht ermittelten Konzentrationen läßt sich mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes nach Gleichung (4) (vgl. Kap.V.) eine Dissoziationskonstante $K_D = 10^{-6} - 10^{-7}\text{M}$ berechnen (Tab.1). Die relativ hohe Abweichung vom Literaturwert ist dadurch zu erklären, daß die Konzentration an freiem Enzym $\frac{[\text{P}_f]}{[\text{P-Rif}]} \approx 1$ unter den gewählten Bedingungen (Sättigungsgrad $\frac{[\text{P-Rif}]}{[\text{P}_t]} \approx 1$) aus der

Tab.1

Gleichgewichtsdialyse mit RNA-Polymerase aus E.coli

Die Dialysekammern enthielten 20 μl einer Lösung von RNA-Polymerase (Rumpfenzym) in Puffer D mit 5% (v/v) Glycerin den unten angegebenen Konzentration $[\text{P}_t]$ bzw. 20 μl einer wässrigen $[^3\text{H}]$ Rifampicinlösung ($6 \cdot 10^{-5}\text{M}$ bzw. $9 \cdot 10^{-5}\text{M}$). Durchführung der Dialysen und Auswertung vgl. 12.1. und 12.2.

Die Bedeutung der aufgeführten Bezeichnungen sind dem Text bzw. der Gleichung (4) (Kap.V.), nach der die Konstante K_D berechnet wurde, zu entnehmen.

	$[\text{P}_t]$ (10^{-6}M)	$[\text{P-Rif}]$ (10^{-6}M)	$[\text{Rif}_f]$ (10^{-6}M)	$\frac{[\text{P-Rif}]}{[\text{P}_t]}$	K_D (10^{-6}M)
a	2.28	2.0	29	0.88	4
b	2.28	2.26	44	0.99	0.2

Differenz $[P_t - P-Rif]$ zweier gleich großer Zahlen berechnet wird und deshalb mit einem großen Fehler behaftet ist. Versuche bei niedrigerem Sättigungsgrad, bei dem sich die Größen $[P_t]$ und $[P-Rif]$ genügend unterscheiden, sind aufgrund der höchstmöglichen Konzentration der zur Verfügung stehenden Enzymlösung ($10\text{mg/ml} = 2.5 \cdot 10^{-5}\text{M}$) als auch aufgrund der relativ geringen spezifischen Radioaktivität des verfügbaren $[^3\text{H}]$ Rifampicin ($1 \cdot 10^{-6}\text{M} \triangleq 27\text{ IpM}/3\mu\text{l}$) nicht möglich. Eine Abschätzung ergibt, daß mindestens die 10fache spezifische Radioaktivität nötig wäre, um eine Konstante in der Größenordnung von 10^{-9}M berechnen zu können. Der Versuch zeigt jedoch, daß Konstanten in der Größenordnung von 10^{-6}M und darunter mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse unter den gegebenen Voraussetzungen ermittelt werden können.

12.7. Einfluß von Polyäthylenglykol-Verunreinigungen auf die Bindung von $[^3\text{H}]$ Rifampicin durch Rinderserumalbumin

Zur Klärung der Frage, ob die beim Einengen der Proteinlösungen in Gegenwart von Polyäthylenglykol in das Dialysat gelangenden Verunreinigungen neben der Störung der Proteinbestimmung (vgl.6.) auch einen Einfluß auf die Bindung von $[^3\text{H}]$ Rifampicin ausüben, wurden Gleichgewichtsdialysen mit unterschiedlich vorbehandelten Rinderserumalbumin-Lösungen durchgeführt. Lösung a (2.4mg RSA/ml) wurde gegen Puffer D dialysiert. Lösung b (2.4mg RSA/ml) wurde um den Faktor 50 mit Puffer B verdünnt, in Puffer B mit 20% (w/v) Polyäthylenglykol (Typ 20 000) wieder auf die ursprüngliche Konzentration eingeeengt und danach wie Lösung a dialysiert, sodaß ein vergleichbarer Gehalt an Verunreinigungen wie in der Lösung des durch Rifampicin eluierten rb-Proteins (vgl.Kap.I.2.2.) angenommen werden konnte. Mit den Proteinlösungen a und b wurde jeweils die Bindung von $[^3\text{H}]$ Rifampicin bei 2 verschiedenen Konzentrationen gemessen.

Die der Konzentration an proteingebundenem Rifampicin $[P-Rif]$ entsprechende Radioaktivitätsmenge (in $\Delta\text{IpM}/3\mu\text{l}$) ließ innerhalb der Fehlergrenze von 20% (vgl.12.5.) keinen Unterschied in der Rifampicinbindung zwischen der Rinderserumalbumin-Lösung mit und derjenigen ohne Polyäthylenglykol-Verunreinigung erkennen (Tab.2).

13. Osmotischer Schock

13.1. Durchführung des Schocks

Der osmotische Schock wurde nach Nossal und Heppel (1966) mit exponentiellen Zellen (Anzucht vgl.2.2.) durchgeführt. Die Zellen wurden nach dem Abzentrifugieren aus dem Medium 2mal mit je 10ml Puffer (0.01M Tris-HCl pH 7.1 bei 25°C, 0.03M NaCl) von 0°C pro 250mg Zellen (Feuchtgewicht) durch Resuspendieren mit Hilfe einer Pipette mit weiter Auslauföffnung und Zentrifugieren gewaschen (Zentrifugationen: Sorvall, GSA, 5 000 UpM, 15min). Zu 10ml (= 250mg Zellen) einer Suspension S der gewaschenen Zellen in 0.033M Tris-HCl-Puffer von Raumtemperatur (pH 7.1 bei 25°C) in einem Erlenmeyerkölbchen (50ml) wurden unter ständigem Schütteln bei 150 UpM (Mini Shaker, B.Braun Melsungen AG) 10ml Sucroslösung

Tab.2

Gleichgewichtsdialyse mit Rinderserumalbumin mit und ohne Polyäthylenglykol-Verunreinigung

Je 20µl der verdünnten RSA-Lösungen a und b (vgl.Text) mit 0.91mg Protein/ml wurden gegen je 20µl wässriger [³H] Rifampicin-lösung (5.8·10⁻⁵M (I) bzw. 1.4·10⁻⁵M (II)) dialysiert (vgl.12.1.). Nach Einstellung des Gleichgewichts wurde die in Proben von je 3µl enthaltene Radioaktivitätsmenge bestimmt (vgl.10.).

PEG = Polyäthylenglykol-Verunreinigung

Bedeutung der Bezeichnungen [P-Rif] und ΔIpM/3µl vgl.Text

	RSA-Lösung	Kammer mit Protein (IpM/3µl)	Kammer ohne Protein (IpM/3µl)	[P-Rif] = (ΔIpM/3µl)
I	a (-PEG)	1 540	1 431	109
	b (+PEG)	1 580	1 449	131
II	a (-PEG)	348	324	24
	b (+PEG)	357	326	21

(0.033M Tris-HCl pH 7.1 bei 25°C, 40% (w/v) Sucrose) mit einer Pipette gegeben. Durch Zugabe von 20µl EDTA-Lösung (0.1M, pH 7.1) wurde in der Zellsuspension eine EDTA-Konzentration von 10^{-4} M eingestellt und anschließend noch 4min geschüttelt. Nach der Zentrifugation (Sorvall, SS34, 9 000 UpM, 5min; Gesamtverweildauer der Zellen in der Sucrose-EDTA-Lösung = 20min) und sorgfältiger Entfernung des Überstands (Plasmolyse-Überstand) wurden die Zellen mit einem gummiuhüllten Glasstab vorsichtig an der Wand des Zentrifugenbechers ausgestrichen, in 20ml $5 \cdot 10^{-4}$ M $MgCl_2$ -Lösung von 0°C suspendiert und noch 7min unter leichtem Rühren im Eisbad gehalten. Der Überstand der anschließenden Zentrifugation (SS34, 8 000 UpM, 5min) wurde zur Entfernung eventuell noch anwesender Zellen nochmals 20min hochtourig zentrifugiert (SS34, 12 000 UpM) und als Schockflüssigkeit auf die Anwesenheit von β -Galaktosidase-Aktivität (vgl.13.2.) untersucht. Ebenso wurde mit dem Plasmolyse-Überstand verfahren. Anschließend Lagerung der Lösungen erfolgte bei -20°C. Zur Untersuchung im Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel wurden Proben von Schockflüssigkeit und Plasmolyse-Überstand konzentriert (vgl.5.2.).

13.2. Bestimmung von β -Galaktosidase-Aktivität

β -Galaktosidase-Aktivität wurde nach Malamy und Horecker (1961) gemessen. Zu 1ml Na-K-Phosphatpuffer pH 7.5 (G) wurden 100µl Schockflüssigkeit, Plasmolyse-Überstand oder Überstand des Ultraschallaufschlusses ganzer Zellen gegeben, und die Enzymreaktion nach Zugabe von 10µl o-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid-Lösung (50mM in H_2O) bei 405nm im Eppendorf-Photometer verfolgt. Für den Ultraschallaufschluß der ganzen Zellen wurden 2ml der Zellsuspension S (vgl.13.1.) mit 8ml Puffer G (siehe oben) verdünnt, bis zu einer Konzentration von 1mM mit 1M $MgCl_2$ -Lösung und bis zu einer Konzentration von 1mM mit 0.1M DTE-Lösung versehen, unter Eiskühlung beschallt (Branson Sonifier, Mikrospitze, 4 x 2.5min bei Stellung 3-4) und zentrifugiert (SS34, 12 00 UpM, 20min). Mit Hilfe der gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten wurde der prozentuale Anteil der in Schockflüssigkeit und Plasmolyse-Überstand vorhandenen β -Galaktosidase-Aktivität an der in ganzen

Zellen vorhandenen Aktivität berechnet. Die in 100 μ l des Ultraschallaufschlusses ($\hat{=}$ 0.5mg Zellen Feuchtgewicht) gemessene Aktivität ($\Delta E_{405}/\text{min} = 0.010 - 0.013$ je nach Kulturansatz) ergibt, mit 2.5 multipliziert, die Enzymaktivität der ganzen Zellen ($= 100\%$), auf welche die in 100 μ l Schockflüssigkeit oder Plasmolyse-Überstand gemessene Aktivität ($\hat{=}$ jeweils 1.25mg Zellen Feuchtgewicht, vgl.13.1.) zur Berechnung des prozentualen Anteils bezogen werden muß.

14. Messung der [^3H] Rifampicinaufnahme von ganzen und schock-behandelten Zellen

Zur Messung der Aufnahme von [^3H] Rifampicin durch verschieden vorbehandelte Zellen im exponentiellen Wachstumsstadium (Anzucht vgl.2.2.) wurden diese nach dem Abzentrifugieren (GSA, 5 000 UpM, 5min) aus dem Medium zunächst in 40ml neutraler Salzlösung (M9-Salze, Hantke (1976): 6g Na_2HPO_4 , 3g KH_2PO_4 , 0.5g NaCl , 0.5g NH_4Cl und 0.25g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pro l) von 0°C pro 1g Zellen suspendiert und bis zu 2h vor weiterer Verwendung auf Eis aufbewahrt. Teile dieser Suspension wurden entnommen und die darin enthaltenen Zellen folgendermaßen vorbehandelt:

Waschen mit M9-Salzlösung:

Die in 10ml der Suspension enthaltenen Zellen ($= 250\text{mg}$) wurden 2mal mit je 10ml M9-Salzlösung von 0°C durch wiederholtes Resuspendieren und Zentrifugieren (SS34, 6 000 UpM, 5min) gewaschen, in 0.5ml der Salzlösung (Raumtemperatur) suspendiert und auf eine Zellzahl von 10^{11} Zellen/ml eingestellt, was einer Extinktion bei 660nm von 0.025 für Zellen der Mutante und von 0.020 für Zellen des Wildtyps E.coli B (jeweils in Verdünnung 1:5 000) entspricht.

Schockbehandlung:

Mit den in 10ml der Suspension enthaltenen Zellen wurde ein osmotischer Schock (vgl.13.1.) durchgeführt. Anschließend erfolgte wie oben Suspension in Salzlösung.

Vorbehandlung mit Tris-EDTA-Puffer:

Die Behandlung der Zellen erfolgte wie beim osmotischen Schock, jedoch wurde keine Plasmolyse der Zellen vorgenommen. Anstelle der Sucroslösung wurde Puffer ohne Sucrose und das angegebene Volumen

an EDTA-Lösung zu den in 0.033M Tris-Puffer suspendierten Zellen gegeben (vgl.13.1.). Bei der anschließenden Suspension der Zellen in MgCl_2 -Lösung wurde im Unterschied zum osmotischen Schock ungekühlte Lösung benutzt. Abschließend erfolgte wie oben Suspension in Salzlösung.

Messung der Rifampicinaufnahme:

Je 100 μ l der Suspensionen der auf die beschriebene Weise vorbehandelten Zellen (10^{11} Zellen/ml M9-Salzlösung) wurden in Eppendorfgefäße gegeben und mit 10 μ l wässriger [^3H] Rifampicinlösung gemischt. 20 μ l dieser Suspension wurden zur Messung der eingesetzten Radioaktivitätsmenge entnommen und gezählt (x IpM). Das Volumen der Zellsuspension beträgt nach der Entnahme der Probe noch 90 μ l, sodaß die zur Inkubation eingesetzte Radioaktivitätsmenge $4.5 \cdot x$ IpM beträgt. Nach 10min wurde die Inkubation durch Zentrifugieren (Eppendorf-Zentrifuge, 8 000g, 1min) beendet, und in 20 μ l des Überstands die Radioaktivität gemessen (y IpM). Die Menge der im Überstand verbliebenen Zellen betrug aufgrund der Extinktionsmessung bei 660nm <1% der sedimentierten Zellen und konnte vernachlässigt werden. Um das Volumen des Überstands zu berechnen, muß vom Volumen der Zellsuspension (= 90 μ l) das Volumen der aus 90 μ l sedimentierten Anzahl der Zellen (= $8.15 \cdot 10^9$) subtrahiert werden, das für mit Salzlösung gewaschene Wildtyp- und Mutantenzellen zu 10 μ l bestimmt wurde. Mögliche Volumenunterschiede zwischen gewaschenen und schockbehandelten Zellen wurden vernachlässigt. Es ergibt sich für den Überstand ein Volumen von 80 μ l, sodaß die im Überstand verbliebene Radioaktivitätsmenge $4 \cdot y$ IpM beträgt. Die Differenz zwischen der eingesetzten und der im Überstand verbliebenen Radioaktivitätsmenge ($4.5x - 4y$ IpM) ergibt die von $8.15 \cdot 10^9$ Zellen gebundene Menge.

Ergebnisse und Diskussion

I. Isolierung von rb-Protein aus E.coli B (rpoB-Mutante)

1. Isolierung von rb-Protein durch Harnstoffelution von Rifampicin-Sephарose

1.1. Affinitätschromatographie

Die Isolierung des rifampicinbindenden Proteins beruht im entscheidenden ersten Schritt auf der Affinität zu N-Demethylrifampicin-Sephарose, die durch chemische Bindung des Rifampicin-Derivates an CNBr-aktivierte Sepharose 4B hergestellt wird.

Aus einer E.coli B - Mutante mit nicht Rifampicin bindender RNA-Polymerase (rpoB-Mutante nach Hayward and Scaife, 1976) wurde durch Ultraschallaufschluß, Behandlung mit Desoxyribonuklease, hochtourige Zentrifugation (2h bei 80 000g) und Ausfällen der bis zu 40% Ammoniumsulfat-Sättigung unlöslichen Proteine ein zellfreier Extrakt gewonnen. Dieser wurde nach Dialyse gegen Puffer A (vgl. Methoden, Kap. 3.2.) über eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Rifampicin-Sephарose-Säule (V = 6ml) geschickt. Nach Waschen mit dem 50fachen Säulenvolumen an Puffer A und dem gleichen Volumen an Puffer B ⁽¹⁾ wurde mit 5 Säulenvolumina Puffer B mit 3M Harnstoff, dann mit 1 Säulenvolumen Puffer B mit 6M Harnstoff eluiert. Die vereinigten Eluate wurden zur Entfernung des Harnstoffs sofort gegen Veronalpuffer dialysiert und im gleichen Puffer in Gegenwart von 20% (w/v) Polyäthylenglykol auf 1% des ursprünglichen Volumens und eine Proteinkonzentration von 10mg/ml eingeeengt (vgl. Methoden, Kap. 3.3.).

Bei der Untersuchung des Harnstoffeluats durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von 0.1% Dodecylsulfat findet man mehrere langsam wandernde Proteinbanden und eine schnell wandernde Bande, die ein Polypeptid mit relativ niedrigem Molekulargewicht,

⁽¹⁾ Auch nach dem Waschen mit diesen vergleichsweise großen Volumina konnte in den Waschfraktionen durch Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese immer noch Fremdprotein, jedoch kein rb-Protein nachgewiesen werden.

das rb-Protein, anzeigt (Abb.4).

Aus dem zellfreien Extrakt von 12.5g Bakterien (Feuchtgewicht) mit einem Proteingehalt von 600mg konnten zwischen 5 und 7mg an die Säule adsorbierten Gesamtproteins gewonnen werden. Die planimetrische Auswertung des Dodecylsulfat-Polyacrylamidgels (Abb.4) ergibt einen Gehalt des Eluats an rb-Protein von etwa 30%, woraus sich eine Ausbeute von rund 2mg errechnen läßt ⁽²⁾.

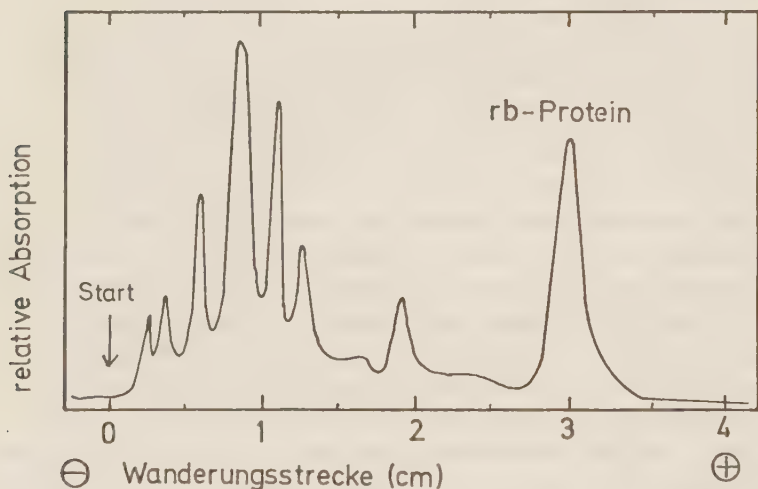


Abb.4

Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese des Harnstoffeluats der Rifampicin-Sephrose

2.5µl des eingeeengten Harnstoffeluats der Rifampicin-Sephrose, gewonnen nach den Angaben in Methoden, Kap.3.3., mit 10mg Protein/ml wurden 1:10 mit dodecylsulfathaltigem Probenpuffer verdünnt. Inkubation und Elektrophorese vgl. Methoden, Kap.5.1. Der rb-Protein-Anteil wurde durch planimetrische Auswertung bestimmt.

(2) Das Säulenmaterial war nach dem Auswaschen mit 50 Säulenvolumina Puffer A mehrere Male wiederverwendbar. Durch allmähliche Freisetzung von N-Demethylrifampicin in freier oder an Sepharose-Partikel gebundener Form war jedoch eine zunehmend geringere Menge des Liganden zur Adsorption von Protein verfügbar, was eine Minderung der Ausbeute um bis zu 50% an eluiertem Gesamtprotein, aber keine Änderung der anteilmäßigen Zusammensetzung zur Folge hatte.

Da bei der Affinitätschromatographie, insbesondere bei Verwendung eines hydrophoben Liganden wie Rifampicin, neben der spezifischen Bindung mit relativ hoher Affinität auch eine Anzahl von Bindungen unspezifischer Natur wirksam werden (Jenissen, 1977), mußte die Belastbarkeit der Säulenfüllung für eine optimale Ausbeute an rb-Protein bei gleichzeitig möglichst geringer Adsorption von Fremdprotein bestimmt werden. Wurden gleiche Mengen zellfreien Extraktes auf verschieden große Gelvolumina aufgetragen, so nahm der Proteingehalt im jeweiligen Harnstoffeluat mit dem Gelvolumen zu. Der Anteil der Eluate an rb-Protein bewegte sich dabei zwischen 22% und 30% (Tab.3). Diese Unterschiede können innerhalb der bei der Proteinbestimmung und der planimetrischen Auswertung von Gelen möglichen Fehlerbreite liegen. Dennoch wird deutlich, daß für eine optimale Ausbeute an rb-Protein ein Gelvolumen von mindestens 6ml bei der Adsorption aus dem zellfreien Extrakt von 12.5g Bakterien (Feuchtgewicht) notwendig ist.

Tab.3

Ermittlung der optimalen Ausbeute an rb-Protein bei der Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie wurde mit dem zellfreien Extrakt aus jeweils 12.5g E.coli B M 1175 (rpoB-Mutante) durchgeführt (vgl. Methoden, Kap.3.3.). Der Proteingehalt des zellfreien Extraktes betrug 600mg und wurde wie derjenige der Harnstoffeluate nach den Angaben in Methoden, Kap.6. bestimmt. Der jeweilige prozentuale Anteil der Eluate an rb-Protein ergab sich durch planimetrische Auswertung von Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelen (vgl. Methoden, Kap.5.1.) und wurde zur Berechnung der Ausbeute an rb-Protein benutzt.

Gelvolumen (ml)	Proteingehalt des Harnstoff- eluats (mg)	rb-Protein	
		Anteil im Eluat (%)	Ausbeute (mg)
2.8	3.2	25	0.8
6.0	5.8	30	1.7
9.0	6.8	22	1.5

Um bei der Adsorption an Rifampicin-Sepharose unspezifische Ladungswechselwirkungen zwischen den Proteinen sowie zwischen Protein und Gelmatrix bzw. Ligand weitgehend auszuschalten, wurde die hohe Salzkonzentration von 1M KCl (Puffer A) gewählt. Versuche zur Adsorption in Gegenwart von 0.3M KCl (Puffer B) hatten gezeigt, daß, im Vergleich mit den Ergebnissen nach Adsorption in Gegenwart von 1M KCl, in den vereinigten Harnstoffeluaten die Gesamtmenge an eluiertem Protein um rund 10% erhöht und der Anteil an rb-Protein um etwa den gleichen Betrag erniedrigt waren. Vorausgegangene Versuche zur Elution hatten ergeben, daß zusätzliches Waschen mit einem Säulenvolumen Puffer B mit 6M Harnstoff im Anschluß an die Elution durch 3M Harnstofflösung die Ausbeute an Gesamtprotein um 20% erhöhte, ohne daß eine Veränderung in der Proteinzusammensetzung des Eluats beobachtet werden konnte. Deshalb wurde die Elution in der beschriebenen Weise mit 3M und 6M Harnstofflösung vorgenommen ⁽³⁾.

1.2. Cellogelblock-Elektrophorese

Da das Harnstoffeluat der Rifampicin-Sepharose außer dem rb-Protein noch eine Reihe anderer Proteine enthält (Abb.4), mußte ein weiterer Reinigungsschritt angeschlossen werden. Die Analyse des Proteingemisches auf Cellogelstreifen zeigte eine Proteinbande, die im Vergleich mit den meisten Begleitproteinen eine relativ hohe, negative Ladungsdichte unter den gegebenen Bedingungen bei pH 8.8 aufweist, und die als rb-Protein identifiziert werden konnte (Abb.5). Dies wurde zur Isolierung des Proteins aus dem vorliegenden Gemisch durch präparative Elektrophorese auf Cellogelblöcken genutzt. Hierzu wurde je 1ml des eingeengten Harnstoffeluats der Rifampicin-Sepharose auf einen Cellogelblock

(3) Aus Harnstoff kann im alkalischen Medium durch Umlagerung Cyanat entstehen. Die Gefahr einer irreversiblen Denaturierung des Proteins durch chemische Reaktion von nukleophilen Proteingruppen mit Cyanat ist jedoch gering, da in Gegenwart des primären Amins Tris gearbeitet wird.

aufgetragen. Nach 8stündiger Elektrophorese wurde die rb-Protein-Bande durch Papierabklatsch lokalisiert, der betreffende Gelstreifen ausgeschnitten (Abb.5) und durch Zentrifugieren ausgepreßt (vgl.Methoden, Kap.4.3.). Die hierbei gewonnene Proteinlösung (ca.4ml/Cellogelblock) enthielt aufgrund der planimetrischen Auswertung von Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelen rb-Protein in 40-50% Ausbeute, bezogen auf den Anteil im Eluat der Rifampicin-Sephadex. Nach Dialyse gegen Puffer B wurden die bei mehreren Elektrophoresen gewonnenen und vereinigten Proteinlösungen im Dialysierschlauch durch Einbetten in trockenes Sephadex G-25 auf 6% des ursprünglichen Volumens und eine Proteinkonzentration von etwa 5mg/ml eingeengt und zur Aufbewahrung nochmals gegen Puffer B dialysiert.

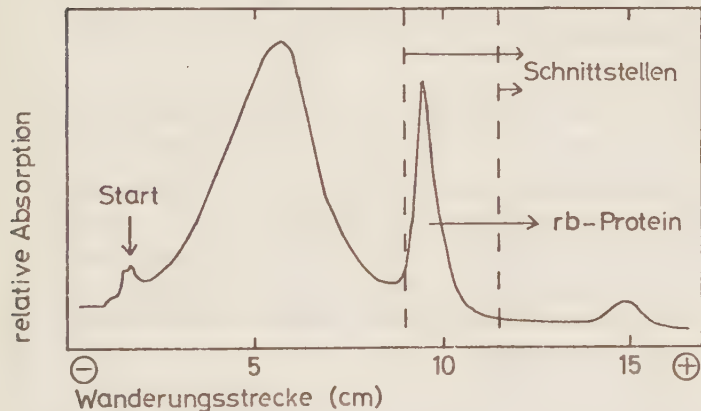


Abb.5

Elektrophorese des Harnstoffeluats der Rifampicin-Sephadex auf Cellogelstreifen

10µl des eingeengten Harnstoffeluats (Abb.4) mit 100µg Protein wurden auf einen Cellogelstreifen aufgetragen. Elektrophorese vgl.Methoden, Kap.4.2.

Aufzeichnung: Chromoscan 200 (Joyce Loebel), Messung in Reflektion (Filter 620nm)

Zur Identifizierung der rb-Protein-Bande wurden entsprechend 150µl Harnstoffeluat auf einem Cellogelblock (30x170x2.5mm) elektrophoretisch aufgetrennt. Der Block wurde in Querstreifen von je 10mm Breite zerschnitten, die einzeln durch Zentrifugieren ausgepreßt wurden (vgl.Methoden, Kap.4.3.). Die Untersuchung der so gewonnenen Lösungen auf Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelen (vgl. Methoden, Kap.5.1.) ergab die Position des rb-Proteins.

Aus 600mg Gesamtprotein im zellfreien Extrakt von 12.5g Bakterien (Feuchtgewicht) konnte so durch Affinitätschromatographie und präparative Elektrophorese etwa 1mg rb-Protein in konzentrierter Lösung gewonnen werden (Präparation I).

Das Proteinpräparat konnte mindestens 4 Monate bei 4°C oder in eingefrorenem Zustand (-20°C) aufbewahrt werden, ohne daß Veränderungen in der Affinität zu Rifampicin-Sephrose (vgl.Kap.I.1.4.) festzustellen waren. Nach einer Lagerung von 12 Monaten bei -20°C konnte aufgrund der Ergebnisse von Gleichgewichtsdialysen (vgl. Kap.V., Fußnote 13) ebenfalls keine Abnahme der Affinität zu Rifampicin beobachtet werden.

1.3. Reinheitsprüfung

Die Proteinpräparation wurde mit mehreren Methoden auf ihre Reinheit überprüft:

a Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von 0.1% Dodecylsulfat und Untersuchung auf Protease-Verunreinigungen

Bei der Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese des isolierten Proteins (aufgetragene Menge: 9.2µg) konnte nur eine scharfe Proteinbande festgestellt werden (Abb.6). Bei einer Nachweisgrenze von 0.1-0.2µg Protein nach Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue (Weber et al.,1972) kann der Anteil einer möglichen Fremdprotein-Bande also höchstens 2% betragen.

Mögliche Protease-Verunreinigungen können oft nicht anhand ihrer Banden im Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel, sondern nur aufgrund ihrer katalytischen Aktivität identifiziert werden (Weber et al., 1972). In Anwesenheit von Dodecylsulfat ist einerseits als Folge der Denaturierung der proteolytische Abbau eines Proteins erleichtert, andererseits sind Proteasen oft relativ stabil gegen das Detergenz (van Heyningen,1972). Aus diesem Grund ist während einer Inkubation bei Raumtemperatur oder bei 37°C Abbau möglich und am Auftreten zusätzlicher Banden von Abbauprodukten erkennbar. Eine sofortige Proteindenaturierung bei 100°C läßt dagegen keine nennenswerte Proteasenaktivität mehr zu (Weber and Osborn,1975).

Dodecylsulfat-Polyacrylamidgele von rb-Protein nach Inkubation bei 100°C (5min), 37°C (30min) und Raumtemperatur (30min) ließen jeweils nur die Bande des rb-Proteins erkennen (Abb.6). Die Anwesenheit von Proteasen in der vorliegenden Präparation ist aufgrund dieses Ergebnisses unwahrscheinlich.

b Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen

Da bei der Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese die Beweglichkeit der Polypeptidketten i.a. eine Funktion ihrer Molekulargewichte ist, können mit dieser Methode nur mögliche Verunreinigungen erfaßt werden, die unter den Bedingungen der Elektrophorese eine von der des rb-Proteins abweichende Größe besitzen. Verunreinigungen, die aufgrund ihrer Ladung oder ihres Molekulargewichtes unter nicht denaturierenden Bedingungen eine andere elektrophoretische Beweglichkeit als das rb-Protein aufweisen,

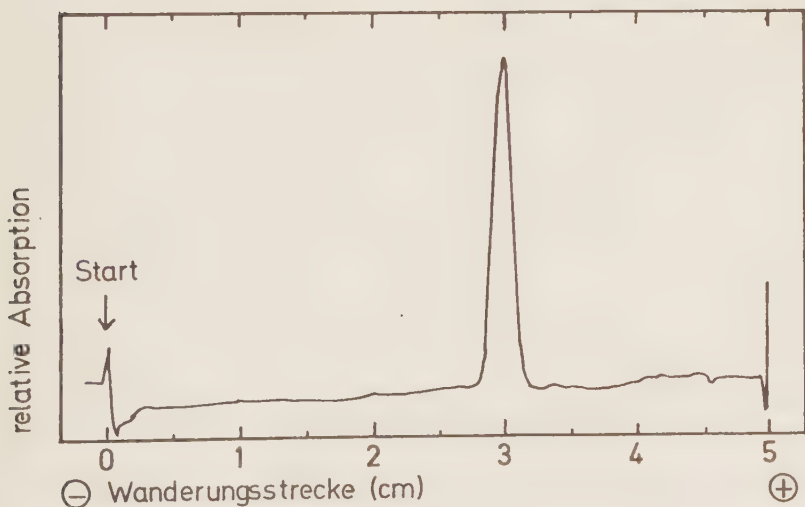


Abb.6

Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von rb-Protein

20µl einer Lösung des renaturierten rb-Proteins (Präparation I) mit 9.2µg Protein wurden 1:5 mit dodecylsulfathaltigem Puffer verdünnt. Elektrophorese vgl. Methoden, Kap.5.1. Inkubation bei 100°C (5min), bei 37°C (30min) und bei Raumtemperatur (30min) lieferten gleiche Ergebnisse.

können durch Polyacrylamidgel-Elektrophoresen bei verschiedenen Acrylamidkonzentrationen und pH-Werten erfaßt werden (Hedrick and Smith, 1968).

Durch Disc-Elektrophorese bei pH 9.5 (Konzentrierung der aufgesetzten Proteinlösung bei pH 8.3, Trennung bei pH 9.5 im Gel) konnte bei einer Proteinmenge von 9 µg im Gel zusätzlich zur rb-Proteinbande nur eine Fremdbande mit etwas niedrigerer elektrophoretischer Beweglichkeit und einem Anteil am Gesamtprotein von 5% festgestellt werden (Abb.7), die später dem Tetrameren des rb-Proteins zugeordnet werden konnte (vgl. Kap. III.3.2.). Das gleiche Ergebnis lieferten sowohl Disc-Elektrophoresen bei anderen Acrylamidkonzentrationen zwischen 3.75% und 11.25% (vgl. Kap. III.3.2.) als auch normale Polyacrylamidgel-Elektrophorese bei pH 8.5 (Trennung bei pH 8.5 im Gel ohne vorherige Konzentrierung; 7.5% Acrylamid). Eine Abschätzung des möglichen Verunreinigungsanteils ergibt das gleiche Ergebnis wie bei der Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

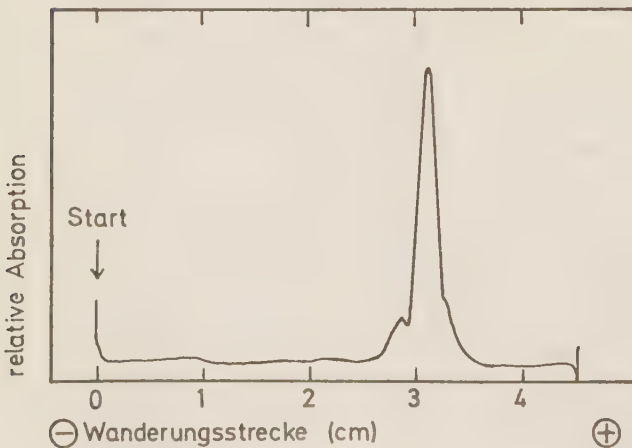


Abb.7

Disc-Elektrophorese von rb-Protein

32 µl einer Lösung des renaturierten rb-Proteins (Präparation I) mit 0.28 mg Protein/ml Puffer B (= 9 µg Protein) wurden 1:1 mit Probenpuffer verdünnt und auf ein Gel mit 7.5% Acrylamid aufgetragen. Elektrophorese vgl. Methoden, Kap. 5.3. Der relative Anteil der zusätzlichen Bande wurde durch planimetrische Auswertung bestimmt.

Die Ergebnisse bei der Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, der Disc-Elektrophorese und der Normalgel-Elektrophorese zeigen, daß das Protein in der vorliegenden Präparation einzelne verunreinigende Proteine in einem Anteil von höchstens 2% enthält.

1.4. Erneute Bindung des renaturierten Proteins an Rifampicin-Sephарose

Wenn das isolierte Protein ein spezifisch Rifampicin bindendes Protein ist, so sollte es möglich sein, das mit Harnstofflösung desorbierte Protein nach Renaturierung und Abtrennung der Begleitproteine wieder an Rifampicin-Sephарose zu binden.

Zu diesem Bindungsversuch wurde das 10fache Volumen an Rifampicin-Sephарose verwandt, das zur Gewinnung der entsprechenden Menge an rb-Protein notwendig gewesen war, um ein verfälschtes Ergebnis wegen möglicher Überlastung des Gels sicher auszuschließen. Die Affinitätschromatographie ergab, daß in den Durchlauf- und Waschfraktionen der Säule zusammen etwa 20% der auf das Gel aufgetragenen Menge an rb-Protein enthalten waren, während 75% gebunden und wieder mit Harnstofflösung desorbiert werden konnten (Tab.4). Es wurden vergleichbare Ergebnisse mit frisch gewonnener rb-Protein-Lösung als auch mit Lösungen erhalten, die 4 Monate bei 4°C oder -20°C aufbewahrt worden waren.

Während 20% des rb-Proteins, wahrscheinlich aufgrund einer irreversiblen Denaturierung im Verlauf der Isolierung, keine Bindungsfähigkeit mehr zeigten, konnten also 75% des Proteins erneut an Rifampicin-Sephарose gebunden werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß das mit Harnstofflösung von Rifampicin-Sephарose desorbierte und von Fremdproteinen gereinigte Protein eine spezifische Bindungsaffinität für den Liganden Rifampicin besitzt.

Untersuchungen zur Bindung der Begleitproteine:

Ein ähnlicher Versuch sollte auch dazu dienen können, die Frage nach der Affinität der Proteine zu klären, die bei der Affinitätschromatographie zusammen mit dem rb-Protein durch Harnstofflösung von Rifampicin-Sephарose desorbiert werden.

Die Begleitproteine besitzen ein deutlich höheres Molekulargewicht in Gegenwart von Dodecylsulfat (vgl. Abb.4). Durch Gel-filtration an Sephadex G-100 gelang eine teilweise Abtrennung dieser Proteine vom rb-Protein (Abb.8). Hierbei wurden zwei Fraktionen unterschiedlicher Zusammensetzung gewonnen. Fraktion I enthält nur die Begleitproteine und kein rb-Protein, während in Fraktion II infolge der teilweisen Abtrennung von Begleitproteinen das rb-Protein angereichert vorliegt (Abb.9). Mit beiden Fraktionen wurden Bindungsversuche in gleicher Weise wie mit dem gereinigten rb-Protein durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Proteine der Fraktion I vollständig in den Durchlauf- und Waschfraktionen auftraten und durch Behandlung mit 6M Harnstofflösung kein Protein desorbiert werden konnte. Fraktion II dagegen wurde quantitativ erneut an

Tab.4

Erneute Bindung des renaturierten rb-Proteins an Rifampicin-Sepharose

74µg renaturiertes rb-Protein wurden nach Dialyse gegen Puffer A auf ein Volumen von 1ml mit Puffer A aufgefüllt. 950µl dieser Lösung wurden auf eine Rifampicin-Sepharose-Säule (V = 2.5ml) aufgetragen. Es wurde mit 1 Säulenvolumen Puffer A gewaschen und anschließend mit 2 Säulenvolumina Puffer B mit 6M Harnstoff eluiert (Durchlaufgeschwindigkeit jeweils 4ml/h). In den vereinigten Durchlauf- und Waschfraktionen sowie in den vereinigten Harnstofffraktionen wurde durch planimetrische Auswertung von Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelen (vgl. Methoden, Kap.5.1.) der relative Gehalt an rb-Protein bestimmt und auf die in gleicher Weise ermittelte rb-Proteinmenge in der auf die Säule aufgetragenen Proteinlösung (=100%) bezogen.

	Gehalt an rb-Protein (%)
Ausgangslösung	100
vereinigte Durchlauf- und Waschfraktionen	20
vereinigtes Harnstoff- eluat	75

Rifampicin-Sephärose gebunden und konnte in unveränderter Zusammensetzung mit Harnstofflösung wieder eluiert werden. Eine Adsorption der Begleitproteine setzt nach diesem Ergebnis die Anwesenheit von rb-Protein voraus und kann nicht auf direkter Wechselwirkung mit Rifampicin-Sephärose beruhen, sodaß diese Proteine im Gegensatz zum rb-Protein keine rifampicin-bindenden Proteine sein können.

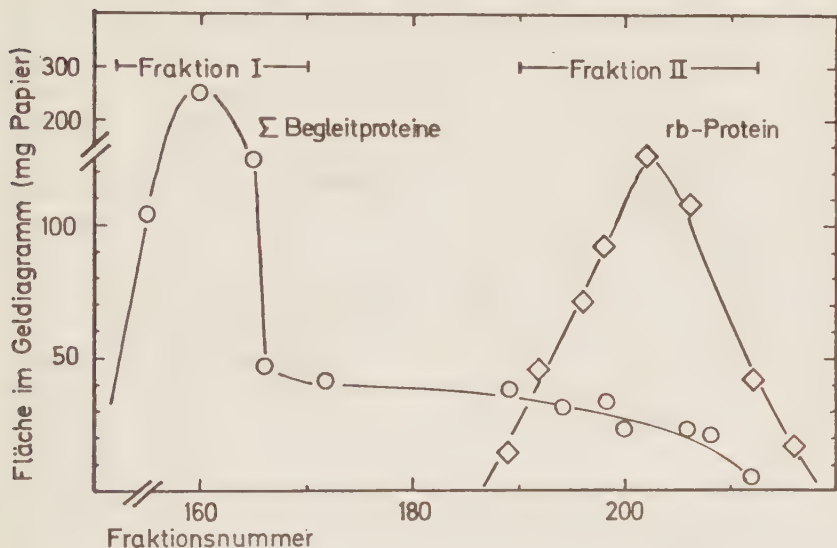


Abb. 8

Gelfiltration des Harnstoffeluats der Rifampicin-Sephärose an Sephadex G-100

Die Gelfiltration erfolgte in Puffer mit 0.01M Tris-HCl pH 7.9, 0.3M KCl, 0.4mM DTE an Sephadex G-100 (Vorbereitung des Gelmaterials vgl. Firmenvorschrift Pharmacia). 7mg des mit Harnstofflösung von Rifampicin-Sephärose desorbierten Proteingemisches (vgl. Abb. 4) wurden nach Dialyse gegen obengenannten Puffer mit 5% Glycerin in einem Volumen von 4ml auf die Säule ($\phi = 20\text{mm}$, Höhe des Gelbetts = 97cm) aufgetragen. Das Eluat wurde in Fraktionen von 0.7ml aufgefangen (Durchlaufgeschwindigkeit 6ml/h). Je 95 μl der Fraktionen wurden auf Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelen (vgl. Methoden, Kap. 5.1.) auf ihre Zusammensetzung untersucht, und die enthaltenen, relativen Proteinmengen durch planimetrische Auswertung bestimmt. In den Fraktionen I und II wurden die jeweils bezeichneten Einzelfraktionen vereinigt.

Die notwendige Beteiligung des rb-Proteins bei der Adsorption der Begleitproteine kann keine eindeutige Erklärung für deren Bindungsverhältnisse bieten, deutet aber wiederum auf die spezifische Wechselwirkung dieses Proteins mit dem trägergebundenen Liganden Rifampicin hin.

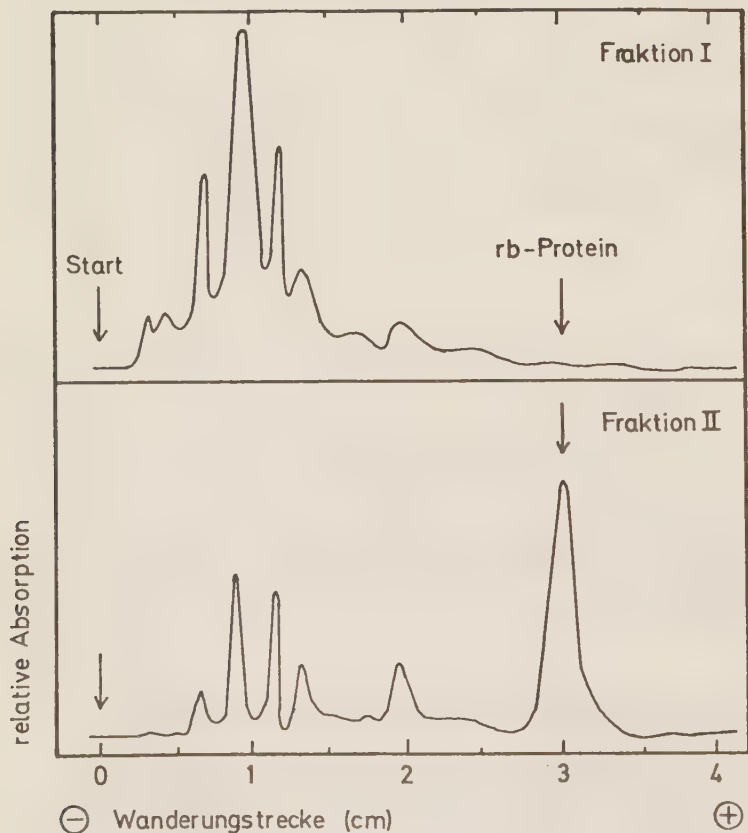


Abb.9

Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Fraktionen I und II nach Gelfiltration an Sephadex G-100

Je 50 μ l der Fraktionen I und II (vgl. Abb.8) mit 15-20 μ g Protein wurden 1:1 mit dodecylsulfathaltigem Puffer verdünnt. Elektrophorese vgl. Methoden, Kap.5.1.

2. Isolierung von rb-Protein durch spezifische Desorption mit Rifampicin

2.1. Nachweis der spezifischen Bindungsaffinität für Rifampicin und Rifamycin SV

Bei der Affinitätschromatographie spielen neben der spezifischen Bindung durch den Liganden i.a. auch unspezifische Wechselwirkungen eine beträchtliche Rolle (Jenissen, 1977). Wenn das rb-Protein spezifisch an Rifampicin bindet, muß es entsprechend dem Prinzip der Affinitätschromatographie möglich sein, das adsorbierte Protein mit Rifampicin spezifisch zu eluieren.

Hierzu wurde durch Ultraschallbehandlung einer Bakteriensuspension von E.coli B (rpoB-Mutante) und anschließende Zentrifugation zur Beseitigung unlöslicher Partikel ein roher, zellfreier Extrakt gewonnen und zur Proteinadsorption über Rifampicin-Sepharose gegeben. Nach dem Waschvorgang wurde mit 1mM Rifampicinlösung eluiert. Das Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel der vereinigten Elutionsfraktionen zeigte die Anwesenheit von rb-Protein mit einem Verunreinigungsanteil von etwa 15% (Abb.10).

Das rb-Protein besitzt also eine spezifische Bindungsaffinität für Rifampicin und wird nicht aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen an Rifampicin-Sepharose adsorbiert.

Aufgrund dieses Versuches kann jedoch nicht entschieden werden, welcher Teil des Rifampicin-Moleküls für die spezifische Bindungsaffinität verantwortlich ist. Rifampicin ist ein halbsynthetisches Derivat des natürlich vorkommenden Rifamycin ϵ bzw. seiner Aktivierungsprodukte Rifamycin S und SV. Die Rifamycine sind Ansaverbindungen und enthalten ein aromatisches Ringsystem, das durch eine aliphatische Brücke überspannt ist (Wehrli and Staehelin, 1971). Das Derivat Rifampicin besitzt einen Piperazinyl-imino-methyl-Rest in Position 3 des aromatischen Molekülteils (Abb.30). Die Bindungsaffinität des rb-Proteins könnte also sowohl gegen das natürliche Grundgerüst des Moleküls als auch gegen den hydrophoben synthetischen Rest gerichtet sein. Um dies zu klären, wurde untersucht, ob auch mit Rifamycin SV das rb-Protein spezifisch von Rifampicin-Sepharose eluiert werden kann.

In einem der Desorption mit Rifampicin sonst völlig analog durchgeführten Versuch wurde mit Rifamycin SV- anstelle von Rifampicinlösung eluiert. Das Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel der vereinigten Elutionsfraktionen zeigte die Anwesenheit von rb-Protein in gleicher Menge und mit gleichem Verunreinigungsanteil wie nach Desorption mit Rifampicin (vgl. Abb.10).

Mit Rifamycin SV gelingt also die spezifische Desorption des rb-Proteins in gleicher Weise und mit vergleichbarer Ausbeute. Als Folgerung hieraus ergibt sich, daß die Spezifität des Proteins nicht gegen den synthetischen Teil des Rifampicin-Moleküls, sondern gegen das natürliche Grundgerüst der Rifamycine gerichtet ist.

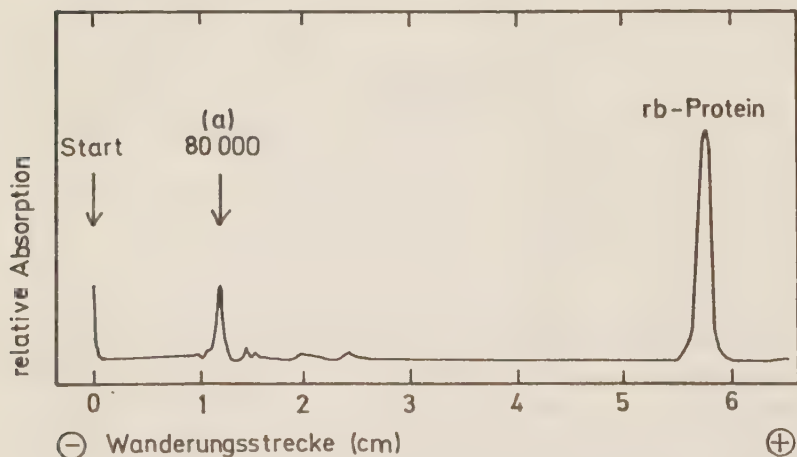


Abb.10

Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese des durch Elution mit Rifampicin gewonnenen rb-Proteins

Der rohe, zellfreie Extrakt aus 6g der rpoB-Mutante von *E.coli* B (Feuchtgewicht; Herstellung vgl. Methoden, Kap.3.4.) wurde nach Dialyse gegen Puffer A über eine Rifampicin-Sepharose-Säule ($V = 2.9\text{ml}$) gegeben. Nach dem Waschen mit je 20 Säulenvolumina Puffer A und Puffer B wurde mit 3.5 Säulenvolumina einer 1mM Rifampicinlösung in Puffer C eluiert. 10 μl des vereinigten Eluats ($\approx 12\text{ml}$) wurden 1:1 mit dodecylsulfathaltigem Probenpuffer verdünnt und auf das Gel aufgetragen. Elektrophorese vgl. Methoden, Kap.5.2. Der Verunreinigungsanteil wurde durch planimetrische Auswertung bestimmt.

Bande (a) vgl. Fußnote (4) S.45

2.2. Isolierung von rb-Protein durch spezifische Desorption

Durch spezifische Elution der Rifampicin-Sepharose-Säule mit Rifampicin kann nach den vorliegenden Ergebnissen das rb-Protein im ersten Anreicherungs-schritt bereits in bedeutend höherer Reinheit gewonnen werden, als dies durch Elution mit Harnstofflösung möglich ist, wo das rb-Protein nur in einem relativen Anteil von 30% im Eluat vorliegt (vgl. Abb. 4). Dieser Vorteil gegenüber der anfänglich zur Isolierung gewählten Methode, die zur Entdeckung des Proteins geführt hatte (vgl. Einleitung) und deshalb zunächst beibehalten worden war, wurde im folgenden genutzt, um mit Hilfe der spezifischen Desorption eine Isolierung von rb-Protein in größerem Maßstab durchzuführen.

Zu diesem Zweck wurde durch Ultraschallbehandlung einer Bakterien-suspension von E. coli B (rpoB-Mutante) und anschließende Zentrifugation zur Beseitigung unlöslicher Partikel ein roher, zell-freier Extrakt gewonnen und zur Adsorption über Rifampicin-Sepharose gegeben. Im Anschluß an den Waschvorgang wurde im Unterschied zum Vorversuch (Kap. I. 2.1.) nicht mit einer Rifampicinlösung konstanter Konzentration, sondern mit einem Rifampicingradienten (0.1-1.5mg/ml) eluiert. Nach dem Auswaschen von Rifampicin wurde mit 6M Harnstofflösung restliches, an das Gelmaterial adsorbiertes Protein eluiert. Bei der Untersuchung der Elutionsfraktionen im Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel zeigte sich, daß rb-Protein bei einer Rifampicinkonzentration von 0.2-0.8mg/ml in seiner Hauptmenge mit einem Verunreinigungsanteil von etwa 5% ⁽⁴⁾ eluiert wurde (Abb. 11 und 12a).

Bei der nachfolgenden Elution von restlichem Protein unter denaturierenden Bedingungen mit 6M Harnstofflösung wurden neben einer geringen Menge rb-Protein (<5% des insgesamt eluierbaren

(4) Die in den Abbildungen 10 und 12 dargestellten Rifampicineluate enthalten ein verunreinigendes Polypeptid (a) mit einem Molekulargewicht von etwa 80 000 in relativen Anteilen von 15% (Abb. 10) bzw. 5% (Abb. 12). Die geringe Menge sowie die Schwankungen des prozentualen Anteils, in dem dieses Polypeptid bei verschiedenen Versuchsansätzen im Eluat auftritt, lassen nicht eine Adsorption aufgrund rifampicinbindender Eigenschaften, sondern eher aufgrund von Wechselwirkungen mit dem rb-Protein und demzufolge gemeinsamer Elution vermuten.

rb-Proteins) eine Vielzahl anderer Proteine desorbiert (Abb.12b). Dieses Eluat zeigt im Gel eine wesentlich größere Anzahl von Proteinbanden als das bei der zuerst beschriebenen Isolierung des rb-Proteins erhaltene Harnstoffeluat, das nach Auftragen eines durch Ammonsulfatfällung vorgereinigten, zellfreien Extraktes gewonnen wurde (vgl.Abb.4)⁽⁵⁾. Der große Unterschied in der Zusammensetzung der beiden Eluate zeigt, daß die Adsorption von Protein an das Säulenmaterial zu einem beträchtlichen Anteil auf unspezifischer Wechselwirkung beruht, die bei Adsorption aus

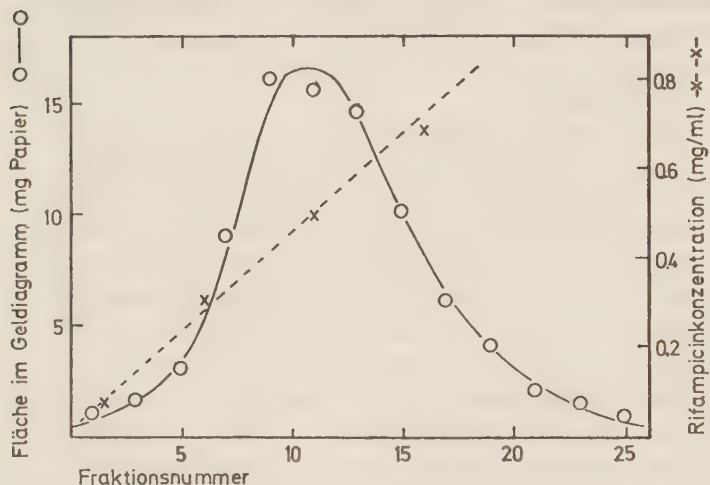


Abb.11

Elution des rb-Proteins von Rifampicin-Sepharose durch einen Rifampicingradienten

Mit dem rohen, zellfreien Extrakt aus 25g *E.coli* B (rpoB-Mutante) wurde eine Affinitätschromatographie mit abschließender Elution des rb-Proteins durch einen Rifampicingradienten nach den Angaben in Methoden, Kap.3.4. durchgeführt. Die in je 10µl der rifampicin-haltigen Elutionsfraktionen enthaltene, relative Menge an rb-Protein wurde durch planimetrische Auswertung eines Dodecylsulfat-Polyacrylamidgels (vgl.Methoden, Kap.5.2.) bestimmt. Der Verlauf des Rifampicingradienten ergab sich aus vergleichenden Extinktionsmessungen von 1:50 verdünnten Proben der Fraktionen und einer Rifampicinlösung bekannter Konzentration bei 475nm. Die Fraktionen 1-25 wurden vereinigt und nach den Angaben in Methoden, Kap.3.4. eingeengt und dialysiert.

(5) Dies gilt auch bei Berücksichtigung des geringeren Auflösungsvermögens von Rundgelen (Abb.4) gegenüber Plattengelen (Abb.12)

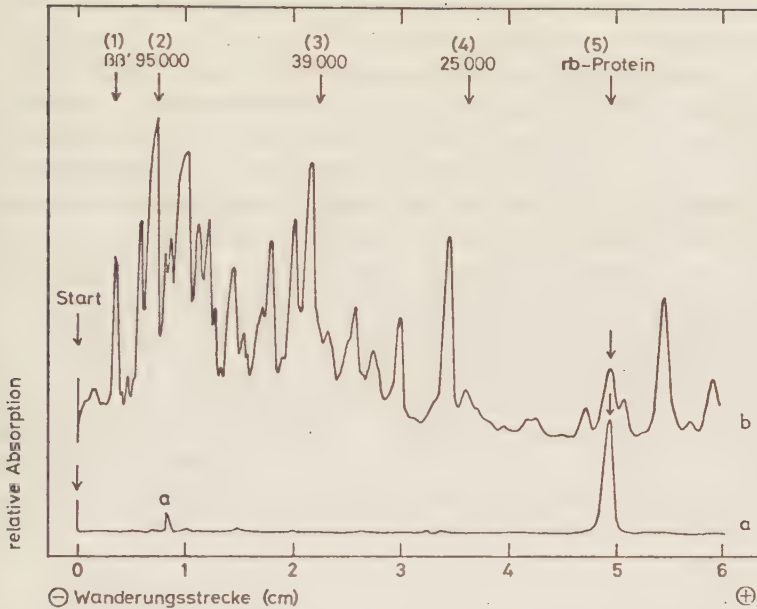


Abb.12

Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese des Rifampicin- und des Harnstoffeluats der Rifampicin-Sephrose

a Aus 200 μ l des vereinigten Rifampicineluats (vgl. Abb.11) mit 0.05mg Protein/ml wurde enthaltenes Protein ausgefällt und in 100 μ l dodecylsulfathaltigem Probenpuffer gelöst. 15 μ l dieser Lösung ($\approx$ 1.5 μ g Protein) wurden auf das Gel aufgetragen. Der Verunreinigungsanteil wurde durch planimetrische Auswertung bestimmt.

b Aus 100 μ l der Fraktion 3 des im Anschluß an die Rifampicin-elution erhaltenen Harnstoffeluats (10 Fraktionen à 1.9ml; vgl. Methoden, Kap.3.4.) der Rifampicin-Sephrose wurde enthaltenes Protein (150 μ g) ausgefällt und in 100 μ l dodecylsulfathaltigem Probenpuffer gelöst. Es wurden 10 μ l mit 15 μ g Protein aufgetragen.

Die Konzentrierung der Proben durch Fällung und die Elektrophorese erfolgten nach den Angaben in Methoden, Kap.5.2.

Eichproteine (je 0.5 μ g im Gel): (1) BB'- Untereinheiten der RNA-Polymerase aus *E.coli* (155 000 bzw. 165 000), (2) und (3) α - bzw. σ - Untereinheiten der RNA-Polymerase aus *E.coli*, (4) Chymotrypsinogen aus Rinderpankreas, (5) rb-Protein (renaturiert; 18 000)

dem rohen, zellfreien Extrakt, wie im vorliegenden Fall, naturgemäß eine wesentlich größere Rolle spielt ⁽⁶⁾.

Das Ergebnis, daß unter diesen Bedingungen rb-Protein spezifisch und in hoher Reinheit mit Rifampicin eluiert werden kann, ist ein Zeichen für eine vergleichsweise hohe, spezifische Affinität zu Rifampicin und spricht dafür, daß in der E.coli - Zelle neben der RNA-Polymerase speziell dem rb-Protein eine Bedeutung im Zusammenhang mit der Bindungsaffinität für Rifampicin zukommt.

Das vereinigte Rifampicineluat (vgl.Abb.11) wurde in Gegenwart von Polyäthylenglykol auf 5% des ursprünglichen Volumens und eine Proteinkonzentration von 2.4mg/ml eingeengt ⁽⁷⁾. Die Ausbeute betrug 3.5mg rb-Protein aus 25g Bakterien (Feuchtgewicht).

Da zur Untersuchung der Eigenschaften ein rifampicinfreies Protein von Vorteil ist, wurde die Proteinlösung zur vollständigen Entfernung des Antibiotikums nach dem Einengen gegen Puffer mit Aktivkohle dialysiert (vgl.Methoden, Kap.3.4.). Freies, in den Dialysepuffer diffundierendes Rifampicin wird dabei durch Aktivkohle gebunden (Wyss and Wehrli,1976) und ständig dem Dissoziationsgleichgewicht mit dem rb-Protein entzogen. Anschließend wurde die Proteinlösung durch Messung der Absorption bei 333nm auf einen möglichen Restgehalt an Rifampicin überprüft. Es zeigte sich, daß der Extinktionswert 1.6% des theoretischen Wertes betrug, der für eine Lösung des mit Rifampicin gesättigten Proteins berechnet und deshalb vernachlässigt werden kann (Tab.5).

Das hier beschriebene Anreicherungsverfahren durch Affinitätschromatographie an Rifampicin-Sepharose beruht sowohl auf spezifischer

(6) Das Harnstoffeluat (Abb.12b) zeigt u.a. auch die Untereinheiten der RNA-Polymerase. Da mit Zellextrakten der rpoB-Mutante, dem Stamm mit nicht rifampicinbindender Polymerase, gearbeitet wurde, kann die Adsorption des Enzyms und sein Auftreten im Eluat nur darauf zurückzuführen sein, daß bei Bakterienanzucht im großen Kulturansatz (vgl.Methoden, Kap.2.1.), aus dem die hier verwendeten Zellen stammten, Revertanten mit sensitiver Polymerase auftreten. Diese bindet an Rifampicin-Sepharose und kann zusätzlicher Ausgangspunkt unspezifischer, in diesem Fall sekundärer Wechselwirkungen für die Adsorption von Fremdprotein sein (vgl. Ratner,1974 und Kap.II.).

(7) Hierbei gelangen niedermolekulare Polyäthylenglykol-Verunreinigungen in die Proteinlösung, die sich störend auf die Proteinbestimmung auswirken (vgl.Methoden, Kap.6.).

Adsorption als auch auf spezifischer Desorption des rb-Proteins, während bei der anfänglich beschriebenen Isolierung zwar ebenfalls spezifische Adsorption stattfindet, die Desorption mit Hilfe von Harnstoff unter denaturierenden Bedingungen jedoch unspezifisch ist.

Ein wesentlicher Vorteil des neuen Verfahrens besteht darin, daß durch die spezifische Elution mit Rifampicin rb-Protein in einem Anreicherungs-schritt in 95%iger Reinheit gewonnen werden kann, während im Harnstoffeluat der Rifampicin-Sephrose der rb-Protein-Anteil nur 30% beträgt (vgl. Abb. 4), und deshalb ein weiterer Reinigungsschritt angeschlossen werden mußte, der die Ausbeute an rb-Protein auf 60% reduzierte. So konnten aus 25g Bakterien (Feuchtgewicht) nur etwa 2mg Protein gewonnen werden, während bei dem spezifischen, in einem Schritt bestehenden Verfahren eine Ausbeute von 3.5mg Protein aus der gleichen Bakterienmenge erzielt werden konnte.

Tab.5

Rifampicin-Restgehalt in der Lösung des spezifisch eluierten rb-Proteins

In einer Lösung des durch Rifampicin-elution gewonnenen und gegen Puffer B mit Aktivkohle dialysierten Proteins, die 0.75mg Protein/ml enthielt, wurde die Rifampicinabsorption bei 333nm im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II gegen Puffer B gemessen. Für die Berechnung der theoretischen Extinktion bei Sättigung des Proteins mit Rifampicin wurde ein Molekulargewicht von 36 500 (vgl. Kap. III.) sowie ein stöchiometrisches Bindungsverhältnis von 1:2 zugrundegelegt (vgl. Kap. V.), und der Extinktionskoeffizient des Rifampicins bei 333nm von $2.7 \cdot 10^4 \text{ cm}^2 \text{ mmol}^{-1}$ (Maggi et al., 1966) benutzt.

	Extinktion bei 333nm	Rifampicingehalt (%)
Berechnung für ein molares Verhältnis rb-Protein:Rifampicin = 1:2	1.12	100
Messung	0.018	1.6

II. Nachweis von spezifisch eluierbarem rb-Protein in E.coli B 1175 (Wildstamm)

In den vorausgegangenen Abschnitten wurde das rb-Protein aufgrund seiner Affinität zu Rifampicin-Sephrose aus der rpoB-Mutante von E.coli B, einem Stamm mit resistenter, nicht an Rifampicin bindender RNA-Polymerase, isoliert. Durch Elution der Rifampicin-Sephrose mit Rifampicin konnte eine spezifische Desorption des rb-Proteins erreicht und der Nachweis einer spezifischen Bindungsaffinität des Proteins der Mutante für Rifampicin geführt werden.

Um eine Aussage darüber zu gewinnen, ob auch der rifampicinsensitive Wildtyp von E.coli B ein Protein mit vergleichbarem Bindungsverhalten besitzt, wurde eine Affinitätschromatographie mit dem zellfreien Extrakt dieser Wildtypzellen auf die gleiche Weise wie bei der Mutante durchgeführt.

Die Elution mit Hilfe des Rifampicingradienten ergab ein Eluat, in dem rb-Protein von hoher Reinheit nachgewiesen werden konnte (Abb.13a).

Die rpoB-Mutante und der sensitive Wildstamm besitzen also ein Protein mit gleicher elektrophoretischer Beweglichkeit und gleichem Bindungsverhalten. Es kann in beiden Fällen aufgrund seiner spezifischen Affinität für Rifampicin in hoher Reinheit durch das Antibiotikum von Rifampicin-Sephrose desorbiert werden (8).

Im Anschluß an die Rifampicineelution wurde restliches Antibiotikum ausgewaschen, und die Säule zusätzlich mit 6M Harnstofflösung eluiert. In diesem Eluat traten neben relativ wenig rb-Protein (< 8% des insgesamt eluierbaren rb-Proteins) hauptsächlich die Untereinheiten der RNA-Polymerase und eine Reihe anderer Proteine (vgl. Ratner, 1974 und Kap.I.1.1.) auf (Abb.13b). Daß RNA-Polymerase, die eine äußerst hohe Affinität zu Rifampicin besitzt, erst durch Denaturierung mit Harnstoff eluiert werden kann, dürfte eine Folge der extremen Gleichgewichtslage bei der Bindung

(8) Das von I.Skropek (1973, unveröffentlicht) isolierte Protein aus E.coli MRE 600, einem Stamm mit ebenfalls rifampicinsensitiver RNA-Polymerase, ist in seiner elektrophoretischen Beweglichkeit im Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel und seinem Bindungsverhalten gegenüber Rifampicin-Sephrose dem hier isolierten Protein gleich.

des Antibiotikums sein ($K_{eq} = 2.7 \cdot 10^{-10} M$ bei $0^\circ C$; Wehrli et al., 1976). Dadurch liegt das Enzym praktisch vollständig an den Liganden Rifampicin gebunden vor. Die Halbwertszeit für den Zerfall des Rifampicin-RNA-Polymerase-Komplexes beträgt 12h bei $0^\circ C$ (Wehrli et al., 1976). Mit der Annahme, daß der Komplex mit trägergebundenem Rifampicin entsprechende Dissoziationseigenschaften aufweist, kann innerhalb der relativ kurzen Elutionszeit

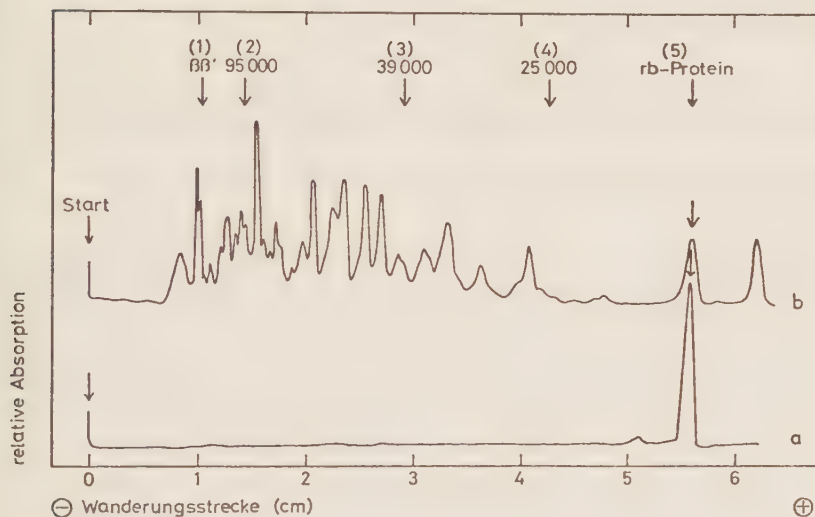


Abb.13

Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese des Rifampicin- und Harnstoffeluats der Rifampicin-Sepharose (Wildstamm)

Mit dem rohen, zellfreien Extrakt aus 8g *E.coli* B 1175 (Wildstamm; Feuchtgewicht) wurde eine Affinitätschromatographie mit abschließender Elution durch einen Rifampicingradienten nach den Angaben in Methoden, Kap.3.4., jedoch unter Reduktion aller Volumenangaben auf 30%, durchgeführt.

a Aus 200µl der Fraktion 9 des Rifampicineluats (30 Fraktionen à 0.5ml) wurde zur Konzentrierung enthaltenes Protein ausgefällt und in 100µl dodecylsulfathaltigem Probenpuffer gelöst. 10µl dieser Lösung wurden auf das Gel aufgetragen.

b Aus 200µl der Fraktion 1 des im Anschluß an die Rifampicin-elution erhaltenen harnstoffeluats (3 Fraktionen à 0.5ml) wurde Protein wie oben ausgefällt und gelöst. Es wurden 10µl aufgetragen. Die Konzentrierung der Proben durch Fällung und die Elektrophorese erfolgten nach den Angaben in Methoden, Kap.5.2.

Eichproteine vgl.Legende zu Abb.12

von ca.1h (bei 4°C) das Gleichgewicht höchstens zu einem Anteil von 10% zugunsten der Bindung an freies Rifampicin verschoben werden. Außerdem beträgt die Konzentration von kovalent gebundenem Rifampicin im Gel etwa 3mg/ml Gelvolumen (vgl.Methoden, Kap.3.1.) gegenüber höchstens 1mg/ml im Elutionspuffer (vgl.Abb.11), sodaß die erneute Bindung frei werdender RNA-Polymerase mit höherer Wahrscheinlichkeit wieder am Liganden erfolgt, und somit keine Desorption erreicht werden kann. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß das rb-Protein eine geringere Affinität zu Rifampicin als die RNA-Polymerase besitzt.

III. Eigenschaften des rb-Proteins aus E.coli B (rpoB-Mutante)

1. UV-Spektrum

Das UV-Spektrum des renaturierten wie des spezifisch eluierten rb-Proteins aus E.coli B (rpoB-Mutante) zeigt die typische Proteinabsorption mit einem Maximum bei 280nm. Außerdem ist eine Schulter bei 260-265nm zu erkennen (Abb.14). Der Extinktionskoeffizient bei 280nm berechnet sich zu $0.17\text{cm}^2\text{mg}^{-1}$ bzw. mit einem Molekulargewicht von 36 500 (vgl.Kap.III.3.) zu $6.4 \cdot 10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die molaren Extinktionskoeffizienten für Proteine verschiedenster Art und Herkunft mit ähnlichem Molekulargewicht (30 000 - 40 000) liegen mit Werten zwischen $25 \cdot 10^3$ und $100 \cdot 10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ beträchtlich höher. Ähnliche Extinktionskoeffizienten wie das rb-Protein besitzen z.B. Insulin ($5.7 \cdot 10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) oder Glukagon ($8.3 \cdot 10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Diese haben aber mit 5 733 bzw. 3 677 bedeutend niedrigere Molekulargewichte (handbook of Biochemistry, 2nd ed., CRC Press, Cleveland, Ohio, 1970).

Da die Proteinabsorption bei 280nm im wesentlichen auf die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin zurückzuführen ist, kann man aus den angeführten Vergleichen auf einen relativ geringen Anteil dieser Aminosäuren im rb-Protein schließen.

Die Schulter bei 260-265nm ist möglicherweise auf die Anwesenheit von Nukleinsäure-Verunreinigungen zurückzuführen. Dies wurde jedoch nicht näher untersucht. Der Anteil der Aminosäure Phenyl-

alanin mit einem Absorptionsmaximum bei 259nm an dieser Schulter kann nur unwesentlich sein, da der Extinktionskoeffizient mit $200\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ gegenüber demjenigen der Nukleinsäuren (ca. $10\,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) einen um den Faktor 50 geringeren Betrag besitzt.

2. Molekulargewicht in Gegenwart von Dodecylsulfat

Das rb-Protein zeigt im Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel eine relativ hohe elektrophoretische Beweglichkeit, die auf ein kleines Molekulargewicht hinweist (vgl. Abb. 4).

Im Molekulargewichtsbereich von 10 000 - 60 000 besteht in dodecylsulfathaltigen Gelen mit 10% Acrylamid eine lineare Abhän-

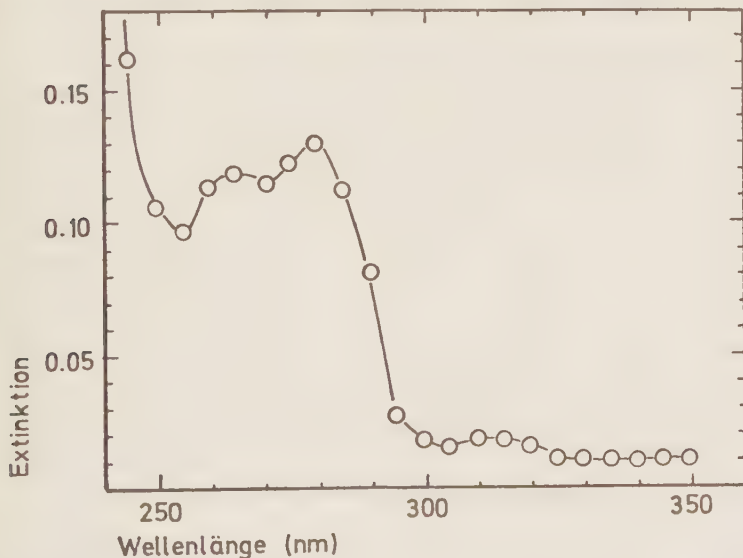


Abb. 14

UV-Spektrum des rb-Proteins

Gegen Puffer B dialysierte Proteinlösung (0,75mg Protein/ml) wurde in einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II in Abständen von 5nm gegen den Dialysepuffer vermessen (Raumtemperatur, Schichtdicke 10mm).

Es ergaben sich gleiche Meßwerte für das renaturierte Protein (vgl. Kap. I.1.) und das spezifisch eluierte Protein (vgl. Kap. I.2.)

gigkeit zwischen der relativen elektrophoretischen Beweglichkeit und dem Logarithmus des Molekulargewichts von Polypeptidketten. Mit Eichproteinen entsprechender Größe läßt sich eine Eichgerade aufstellen, aus der das unbekannte Molekulargewicht entnommen werden kann. Die Fehlerbreite dieser Methode beträgt 5-10% und ist hauptsächlich auf Ladungsunterschiede zwischen den Polypeptidketten zurückzuführen (Shapiro et al., 1967; Weber and Osborn, 1969 und 1975; Dunker and Rueckert, 1969).

a Renaturiertes rb-Protein (vgl. Kap. I.1.) wurde im Gemisch mit den Eichproteinen in Gegenwart von 0.2% Dodecylsulfat und 3% 2-Mercaptoäthanol bei 37°C (30min) oder bei 100°C (5min) inkubiert. Aus der Eichgeraden entnimmt man für das Protein ein Molekulargewicht von $18\,000 \pm 1\,000$ (Abb. 15). Da die Erhöhung der Inkuba-

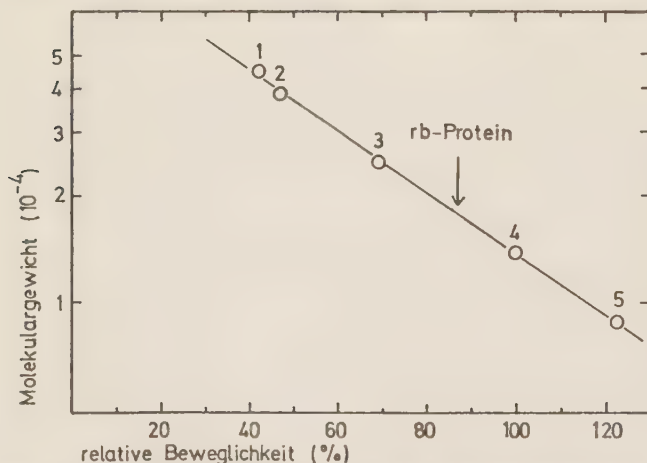


Abb. 15

Molekulargewichtsbestimmung durch Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

2µg renaturiertes rb-Protein (vgl. Kap. I.1.) in 10µl dodecylsulfathaltigem Probenpuffer wurden im Gemisch mit je 5µl der Eichproteinlösungen (je 0.5mg/ml in dodecylsulfathaltigem Probenpuffer) 30min bei 37°C oder 5min bei 100°C inkubiert. Elektrophorese und Auswertung vgl. Methoden, Kap. 5.1.

Eichproteine mit Molekulargewichten: (1) Ovalbumin, 45 000; (2) RNA-Polymerase aus *E. coli*, α-Untereinheit, 39 000; (3) Chymotrypsinogen aus Rinderpankreas, 25 000; (4) Lysozym aus Hühnereiweiß, 14 000; (5) Proinsulin aus Rinderpankreas, 8 900

Die R_F -Werte sind Mittelwerte aus 3 Versuchen und weisen eine Streubreite von 2% auf.

tionstemperatur auf 100°C unter sonst konstant gehaltenen Bedingungen keinen Einfluß auf das Ergebnis zeigte, kann ausgeschlossen werden, daß im nativen Zustand des Proteins durch schwer zugängliche Disulfidbrücken verknüpfte Oligomere vorhanden sind, die erst bei höherer Temperatur gespalten werden können.

b Spezifisch mit Rifampicin eluiertes Protein zeigt bei der Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit (vgl. Abb. 12) und besitzt damit in Gegenwart von Dodecylsulfat die gleiche Größe.

3. Molekulargewicht im nativen Zustand

3.1. Dünnschichtchromatographie an Sephadex G-200

Bei der Dünnschichtchromatographie an Sephadex-Gel ist die Wanderungsstrecke eines Proteins in bezug auf diejenige eines Standardproteins proportional dem Logarithmus des Molekulargewichts (Andrews, 1965; Determann and Michel, 1966).

Mit Cytochrom c als Bezugsprotein zur Berechnung des R_F -Wertes wurde eine Eichgerade aufgestellt, aus der sich für das rb-Protein ein Molekulargewicht von 33 000 $\pm$ 3 000 im nativen Zustand entnehmen läßt (Abb. 16).

Dieser Wert ergab sich sowohl bei Dünnschichtchromatographie in Puffer ohne als auch mit 2-Mercaptoäthanol (10mM) als Schutzreagenz für SH-Gruppen, sodaß eine Aggregation des Proteins als Folge der Oxidation von SH-Gruppen während der Chromatographie ausgeschlossen werden kann.

3.2. Disc-Elektrophorese

Da bei der Dünnschichtchromatographie der Nachweis von Protein durch den Papierabklatsch (vgl. Methoden, Kap. 7.) relativ unempfindlich ist, können eventuell in geringer Konzentration vorliegende Formen des rb-Proteins mit anderem Molekulargewicht als der Hauptanteil mit 33 000 nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde die Molekulargewichtsbestimmung zusätzlich

mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Disc-Elektrophorese nach Maurer, 1971) durchgeführt.

Eine Auftragung der elektrophoretischen Beweglichkeit eines Proteins in Abhängigkeit von der Acrylamidkonzentration im Gel ergibt eine Gerade mit der Steigung $\text{tg } \alpha$. Die Steigung steht in linearem Zusammenhang mit dem Molekulargewicht der betreffenden Proteine, was zum Aufstellen einer Eichgeraden zur Molekulargewichtsbestimmung benutzt wird (Hedrick and Smith, 1968).

a renaturiertes rb-Protein

Polyacrylamidgele des renaturierten Proteins zeigen eine starke Bande mit höherer und eine schwache Bande mit niedrigerer elektrophoretischer Beweglichkeit (vgl. Abb. 7). Aus der Eichgeraden, die durch Elektrophorese von Eichproteinen bei verschiedenen Acrylamidkonzentrationen erhalten wurde, kann ein Molekulargewicht von

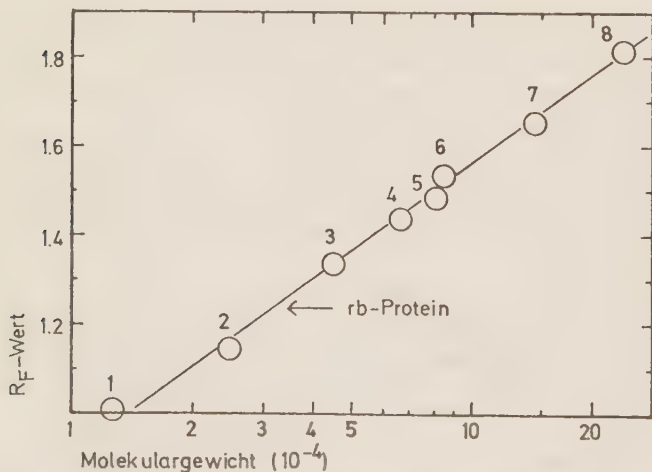


Abb.16

Molekulargewichtsbestimmung durch Dünnschichtchromatographie

Eichproteine und renaturiertes rb-Protein (vgl. Kap. I.1.) wurden jeweils im Gemisch mit Cytochrom c chromatographiert. Durchführung und Auswertung vgl. Methoden, Kap. 7.

Eichproteine mit Molekulargewichten: (1) Cytochrom c, 12 500; (2) Chymotrypsinogen aus Rinderpankreas, 25 000; (3) Ovalbumin, 45 000; (4) Rinderserumalbumin, 65 000; (5) Creatinkinase aus Kaninchenmuskel, 81 000; (6) Citratsynthase aus Schweineherz, 36 000; (7) Alkoholdehydrogenase aus Hefe, 145 000; (8) Katalase aus Rinderleber, 240 000.

Alle R_F -Werte sind Mittelwerte aus 3 Versuchen und weisen eine Streubreite von 5% auf.

$36\ 000 \pm 3\ 000$ für die starke Bande (a) und von $74\ 000 \pm 5\ 000$ für die schwache Bande (b) entnommen werden (Abb.17).

Wurden jeweils gleiche Mengen an renaturiertem rb-Protein aus Lösungen, die 1h bei 25°C und verschiedenen Proteinkonzentrationen in Gegenwart von 0.15M KCl (Puffer C) inkubiert worden waren, auf Polyacrylamidgele aufgetragen, so lag ein umso größerer Anteil der schwächeren Bande vor, je größer die Proteinkonzentration im Inkubationsgemisch war. Andererseits zeigten unterschiedliche Proteinmengen, die aus einer bei konstanter Proteinkonzentration

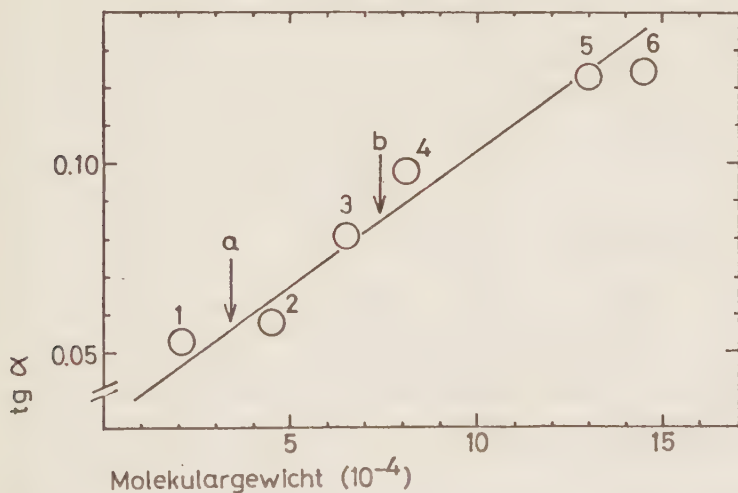


Abb.17

Molekulargewichtsbestimmung durch Disc-Elektrophorese

Je 10 μ l der Eichproteinlösungen (1mg/ml in H₂O) und einer Lösung des renaturierten rb-Proteins (vgl.Kap.I.1.; 0.9mg/ml in Puffer B mit 0.3M KCl) wurden mit je 40 μ l Probenpuffer (vgl.Methoden, Kap.5.3.) verdünnt und auf je ein Gel aufgetragen. In gleicher Weise wurden Elektrophoresen bei 5 verschiedenen Acrylamidkonzentrationen durchgeführt. Durchführung und Auswertung vgl.Methoden, Kap.5.3.

Bezeichnung der Punkte (a) und (b) vgl.Text

Eichproteine mit Molekulargewichten: (1)Trypsininhibitor aus Sojabohne, 21 000; (2)Ovalbumin, 45 000; (3)Rinderserumalbumin monomer, 65 000; (4)Creatinkinase aus kaninchenmuskel, 81 000; (5)Rinderserumalbumin dimer, 130 000; (6)Alkoholdehydrogenase aus Hefe, 145 000.

inkubierten Proteinlösung entnommen waren, im Gel etwa gleiche Anteile der schwächeren Bande (Abb.18). Daraus geht hervor, daß der Prozentsatz dieser Bande im Gel durch die Proteinkonzentration in der Inkubationsmischung bestimmt wird und unabhängig von der auf das Gel aufgetragenen Proteinmenge ist. Die Bande entspricht aufgrund des ermittelten Molekulargewichts von 74 000 dem Tetrameren des rb-Proteins und liegt in umso größerem

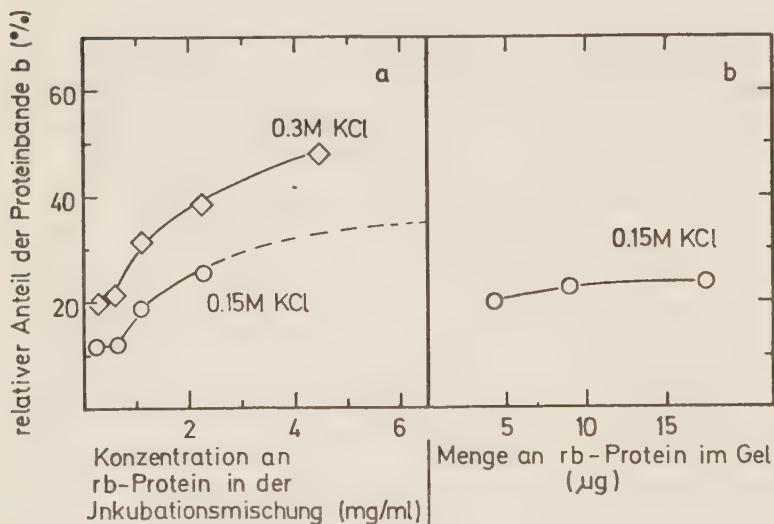


Abb.18

Relativer Anteil der Bande b (Tetramer) des renaturierten Proteins in Abhängigkeit von Protein- und Salzkonzentration

a Renaturiertes rb-Protein (vgl.Kap.I.1.) wurde bei verschiedenen Konzentrationen in Gegenwart von 0.15M KCl (Puffer C) oder 0.3M KCl (Puffer E) 1h bei 25 °C inkubiert, die Lösung 1:1 mit Probenpuffer verdünnt und jeweils das einer Proteinmenge von 8.9µg entsprechende Volumen auf ein Disc-Gel (7.5% Acrylamid) aufgetragen. Elektrophorese vgl.Methoden, Kap.5.3. Die relativen Anteile der Bande b (Tetramer) wurden durch planimetrische Auswertung der Gele bestimmt.

b Renaturiertes rb-Protein wurde bei einer Konzentration von 2.2mg/ml in Gegenwart von 0.15M KCl (Puffer C) inkubiert. Es wurden jeweils die den bezeichneten Proteinmengen entsprechenden Volumina auf Disc-Gele aufgetragen. Alle übrigen Angaben wie oben.

relativem Anteil vor, je höher die Proteinkonzentration in der Inkubationsmischung gewählt wird.

Nach Inkubation in Gegenwart von 0.3M KCl (Puffer E) trat die Bande des Tetrameren in der jeweils 1.5-2fachen Intensität wie nach Inkubation in Gegenwart von 0.15M KCl (Puffer C) im Gel auf (vgl. Abb. 18).

Aus den nach 1stündiger Inkubation bei 25°C im Gleichgewicht vorliegenden Konzentrationen an dimerem und tetramerem Protein kann eine Gleichgewichtskonstante von

$$K = \frac{[rb_4]}{[rb_2]^2} = 10^4 M^{-1}$$

in Gegenwart von 0.3M KCl und von $4 \cdot 10^3 M^{-1}$ in Gegenwart von 0.15M KCl berechnet werden ($[rb_4]$, $[rb_2]$ = Konzentrationen an tetramerem bzw. dimerem Protein im Gleichgewicht).

Dies entspricht einem Energiegewinn unter Standardbedingungen von

$$\begin{aligned} \Delta G^0 &= -RT \ln K \\ &= \frac{-5.5 \text{ kcal/mol}}{\text{bzw.}} \quad (0.3M \text{ KCl}) \\ &\quad -4.9 \text{ kcal/mol} \quad (0.15M \text{ KCl}) \end{aligned}$$

Nach Inkubation in Gegenwart einer Proteinkonzentration von 0.56mg/ml und darunter war bei beiden Salzkonzentrationen ein nahezu konstant bleibender, relativer Anteil an tetramerem Protein (10% bzw. 20%) festzustellen (vgl. Abb. 18) und trat in Form einer relativ diffusen Bande im Gel auf. Dies ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß während der Elektrophorese infolge der Konzentrierung der Proteinklösung im Gel eine höhere Proteinkonzentration entsteht, als sie in der Inkubationsmischung vorlag, und weitere Gleichgewichtseinstellung zugunsten des Tetrameren ermöglicht. Das Auftreten des Tetrameren als diffuse Bande läßt schließen, daß die für die Gleichgewichtseinstellung notwendige Zeit in der Größenordnung der Elektrophoresezeit von 2-3h liegt.

b spezifisch eluiertes rb-Protein

Wurde spezifisch eluiertes rb-Protein in Gegenwart von 0.3M KCl (Puffer E) bei verschiedenen Proteinkonzentrationen inkubiert (1h bei 25°C), so zeigte sich in Polyacrylamidgelen ebenfalls eine Intensitätszunahme der Bande des Tetrameren mit steigender Proteinkonzentration in der Inkubationsmischung. Im Unterschied zum renaturierten Protein jedoch ging der Tetrameranteil mit abnehmender Proteinkonzentration gegen 0%. Außerdem konnte nach Inkubation in Gegenwart von 0.15M KCl (Puffer C) bei Proteinkonzentrationen $\leq 1.2\text{mg/ml}$ kein Tetramer mehr nachgewiesen werden (Abb.19).

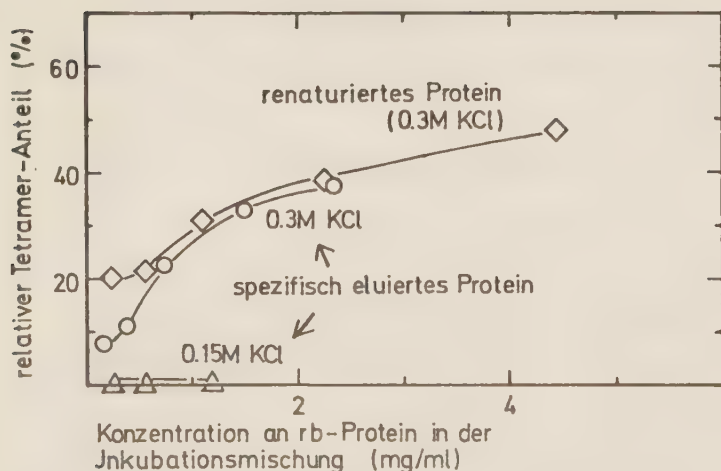


Abb.19

Relativer Anteil der Tetramerbande beim spezifisch eluierten Protein in Abhängigkeit von Protein- und Salzkonzentration

Lösungen des spezifisch eluierten rb-Proteins (vgl. Kap. I.2.) wurden bei verschiedenen Konzentrationen in Gegenwart von 0.3M KCl (Puffer E) oder 0.15M KCl (Puffer C) 1h bei 25°C inkubiert, auf Disc-Gele aufgetragen und diese planimetrisch ausgewertet (vgl. Angaben Legende zu Abb.18 a). Zum Vergleich sind außerdem die Ergebnisse für das renaturierte Protein nach Inkubation in Gegenwart von 0.3M KCl (vgl. Abb.18a) aufgetragen.

3.3. Zentrifugation im Sucroседichtegradienten

Die speziellen Bedingungen bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese und die planimetrische Auswertung der Gele lassen keine korrekte quantitative Aussage über das Mengenverhältnis von dimerem zu tetramerem rb-Protein bei einer gegebenen Proteinkonzentration zu. Insbesondere für die Auswertung der bei der Gleichgewichtsdialyse erhaltenen Daten (vgl.Kap.V.) müssen Aggregationszustand und Molekulargewicht bei gegebener Proteinkonzentration bekannt sein, da in die Berechnungen die molare Proteinkonzentration eingeht.

Lösungen des renaturierten sowie des spezifisch eluierten rb-Proteins mit einer Konzentration von jeweils 0.78mg/ml in Puffer C (0.15M KCl) wurden 1h bei 25°C inkubiert und anschließend durch Zentrifugation im Sucroседichtegradienten nach Martin und Ames (1961) auf die anteilmäßige Zusammensetzung an dimerem und tetramerem Protein untersucht.

Mit dieser Methode können Proteine aufgrund ihrer Größe und Gestalt getrennt werden, wobei zwischen Wanderungsstrecke r im Gradienten und dem Molekulargewicht M zweier Proteine die Beziehung

$$\frac{r_1}{r_2} = \left(\frac{M_1}{M_2} \right)^{2/3} \quad (3)$$

besteht (Martin and Ames, 1961).

Um die Position des erwartungsgemäß geringen Anteils an tetramerem Protein (vgl.Kap.III.3.2.) im Gradienten genau bestimmen zu können, wurde die Zentrifugation in Anwesenheit der Eichproteine Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (80 000) und Triosephosphatisomerase (53 000) durchgeführt. Das Tetramer ist aufgrund seines Molekulargewichts von 74 000 (vgl.Kap.III.3.2.) zwischen den Gipfeln dieser beiden Proteine zu erwarten.

Die Lage der Gipfel der beiden Eichproteine und des rb-Proteins nach der Zentrifugation wurde durch planimetrische Auswertung von Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelen der Gradientenfractionen bestimmt. Aus den sich daraus ergebenden Wanderungsstrecken der Proteine im Gradienten konnte mit Hilfe der Beziehung (3) bezüglich beider

Eichproteine das bereits bekannte Molekulargewicht des nativen rb-Proteins (vgl. Kap. III. 3.1. und 3.2.) bestätigt werden. Es ergab sich ein Wert von $37\,500 \pm 3\,000$. In den Fraktionen zwischen den Gipfeln der beiden Eichproteine, wo möglicherweise anwesendes tetrameres rb-Protein auftreten müßte, konnte kein rb-Protein nachgewiesen werden (Abb. 20). Eine Abschätzung unter Berücksichtigung der Nachweisgrenzen ergibt, daß unter den gewählten Bedingungen der mögliche Anteil an tetramerem rb-Protein weniger als 4% beträgt (9).

Bei den Untersuchungen des renaturierten Proteins mit Hilfe von Polyacrylamidgelen konnte im Gegensatz hierzu noch bei wesentlich niedrigerer Proteinkonzentration ein relativer Anteil von 10% an der dem Tetramer entsprechenden Bande nach Inkubation in Puffer C (0.15M KCl) im Gel festgestellt werden (vgl. Abb. 18a). Das durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnene Ergebnis spricht für die im Kap. III. 3.2. angeführte Vermutung, daß das Auftreten von Tetramer beim renaturierten Protein nach Inkubation bei Proteinkonzentrationen unter 0.56mg/ml im wesentlichen auf eine Konzentrierung der Proteinlösung während der Elektrophorese und nachfolgende Tetramerbildung im Gel zurückzuführen ist.

Zusammenfassung

Die Molekulargewichtsbestimmungen ergaben, daß das rb-Protein unter nicht denaturierenden Bedingungen bei den untersuchten Proteinkonzentrationen zum überwiegenden Teil als Dimeres mit einem mittleren Molekulargewicht von $36\,500 \pm 3\,000$ vorliegt, das aus 2 gleich großen Polypeptidketten aufgebaut ist. Bei 25°C ist nach Untersuchungen in Polyacrylamidgelen in Gegenwart von 0.3M KCl Tetramerbildung mit einer Gleichgewichtskonstanten von

(9) Vom durchschnittlichen Volumen einer Gradientenfraktion von 118µl wurden 50µl ($\hat{=}$ 42%) auf je ein Gel (Nachweisgrenze: 0.2µg Protein, vgl. Kap. I. 1.3.) aufgetragen, sodaß die Nachweisgrenze bei 0.5µg/Fraktion liegt. Nimmt man für möglicherweise vorhandenes Tetramer eine Verteilung auf 8 Gradientenfraktionen an (vgl. Proteinverteilung in Abb. 20), so können maximal $8 \cdot 0.5\mu\text{g} = 4\mu\text{g}$ Protein nicht erfaßt werden, was weniger als 4% der auf den Gradienten aufgetragenen Proteinmenge von 110µg (vgl. Legende zu Abb. 20) entspricht.

$10^4 M^{-1}$ möglich. In Gegenwart von 0.15M KCl ist beim renaturierten Protein diese Gleichgewichtskonstante auf $4 \cdot 10^3 M^{-1}$ erniedrigt, während beim spezifisch eluierten Protein unter diesen Bedingungen bei Proteinkonzentrationen $\leq 1.2 \text{ mg/ml}$ keine Tetramerbildung mehr beobachtet werden kann. Die Tatsache, daß die Tetramerbildung offensichtlich durch hohe Salzkonzentration energetisch begünstigt wird sowie die Größenordnung des dabei frei werdenden Energiebetrags (vgl. Kauzmann, 1959) deuten auf die Beteiligung hauptsächlich hydrophober Wechselwirkungen hin.

Das Vorliegen von Oligomeren bei höherer Proteinkonzentration wird bei verschiedenen Proteinen beobachtet. Das galaktosebindende

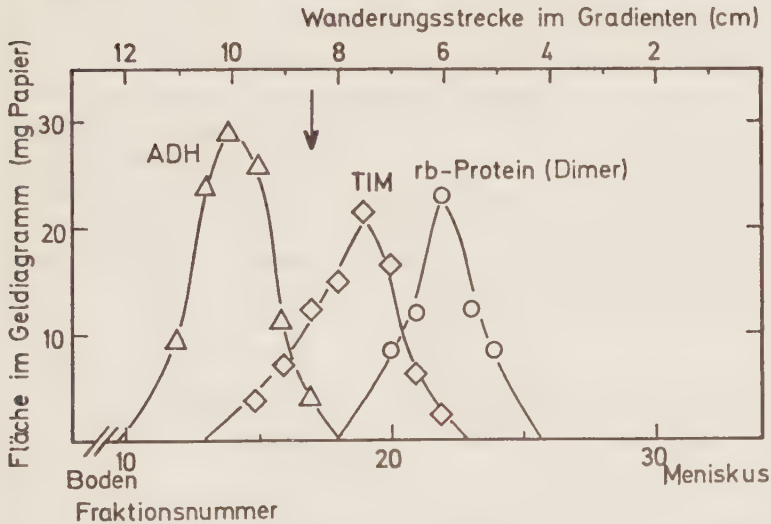


Abb. 20

Zentrifugation im Sucroседichtgradienten

Eine Lösung von renaturiertem oder spezifisch eluiertem rb-Protein (140 μ l mit 0.78mg Protein/ml Puffer C mit 0.15M KCl) wurde nach Inkubation (1h bei 25°C) mit je 5 μ l der Eichproteinlösungen (je 10mg/ml in Puffer C) gemischt und auf den Gradienten aufgesetzt. Durchführung der Zentrifugation und Auswertung vgl. Methoden, Kap. 8.

Eichproteine mit Molekulargewichten:

ADH = Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (80 000)

TIM = Triosephosphatisomerase aus Kaninchenmuskel (53 000)

Der Pfeil bezeichnet die erwartete Position des Tetrameren, die aus der Lage der Eichproteingipfel nach Beziehung (3) berechnet wurde.

Protein aus E.coli kann z.B. teilweise als Dimeres vorliegen (Rasched et al.,1976). Aggregation zu höheren Oligomeren wird von Hämarythrin (Langerman and Klotz,1969) oder von Tryptophanase (Hoch and DeMoss,1972) berichtet.

Die Unterschiede zwischen renaturiertem und spezifisch eluiertem rb-Protein, die allgemein ausgedrückt in erhöhter Aggregations-tendenz des renaturierten Proteins bestehen, sind möglicherweise darauf zurückzuführen, daß das renaturierte Protein im Verlaufe der Isolierung teilweise irreversibel denaturiert wurde. Dies war bereits daraus zu ersehen, daß die Wiederbindung dieses Proteins an Rifampicin-Sephrose nur zu einem Anteil von 75% möglich war (vgl.Kap.I.1.4.). Nicht auszuschließen ist jedoch auch, daß in der Lösung des spezifisch eluierten Proteins anwesende Polyäthylen-glykol-Verunreinigungen (vgl.Fußnote 7, S.48) zum Teil für das unterschiedliche Verhalten verantwortlich sind.

Die genauere Analyse im Sucroседichtegradienten zeigte, daß sowohl in Lösungen des renaturierten als auch des spezifisch eluierten rb-Proteins bis zu Proteinkonzentrationen von mindestens 0.78mg/ml unter den gewählten Bedingungen (1stündige Inkubation bei 25°C und in Gegenwart von Puffer C mit 0.15M KCl) der Anteil an tetra-merem rb-Protein unter 4% liegt und bei Versuchen unter entspre- chenden Bedingungen vernachlässigt werden kann.

IV. Auswirkung der spezifischen Bindung auf molekulare Eigenschaften von rb-Protein und Rifampicin

Ein spezifisches Bindungsverhalten des rb-Proteins zu Rifampicin konnte sowohl durch die Möglichkeit einer erneuten Bindung des renaturierten Proteins an Rifampicin-Sephrose als auch insbe- sondere durch die Möglichkeit der spezifischen Desorption mit Rifampicin gezeigt werden. Die folgenden Untersuchungen des Ein- flusses der spezifischen Bindung auf molekulare Eigenschaften von rb-Protein und Rifampicin sollen zur näheren Beschreibung des Bindungsverhältnisses dienen.

1. Vergleich der Spektren von rb-Protein und Rifampicin
in freiem und gebundenem Zustand

Bei nichtkovalenter Bindung von kleinen Molekülen an Proteine werden in vielen Fällen Lichtabsorptions- bzw. -emissionseigenschaften der bindenden Komponenten in charakteristischer Weise verändert. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden die Spektren von Rifampicin und rb-Protein in gebundenem Zustand mit denjenigen im freien Zustand verglichen ⁽¹⁰⁾. Hierzu wurde das Absorptionsspektrum einer in Gegenwart eines Proteinüberschusses mit Rifampicin inkubierten Lösung des rb-Proteins (molares Verhältnis von rb-Protein-Dimer:Rifampicin = 2:1) im Bereich von 200-340nm gemessen. Da in diesem Bereich sowohl das Protein als auch Rifampicin absorbieren, wird die Summe der Extinktionen der beiden Komponenten im gebundenen Zustand gemessen.

Das Differenzspektrum (rb-Protein + Rif) - (rb-Protein), das durch Differenzbildung zwischen den Extinktionswerten der Inkubationsmischung (rb-Protein + Rif) und denjenigen einer entsprechend konzentrierten Lösung des freien Proteins (rb-Protein) bei jeweils gleichen Wellenlängen berechnet werden kann, entspricht unter der Annahme, daß das Spektrum des rb-Proteins bei der Bindung von Rifampicin nicht geändert wird und gleich dem des freien Proteins ist, dem Spektrum des gebundenen Rifampicin. Dieses Spektrum von gebundenem Rifampicin unterscheidet sich bis auf eine konstante Extinktionsdifferenz über den gesamten Meßbereich, die auf Konzentrationsunterschiede in den einzeln vermessenen Lösungen zurückgehen dürfte, nicht wesentlich von dem des freien Rifampicin (Abb.21a). Die Absorptionseigenschaften von Rifampicin werden aufgrund dieses Ergebnisses bei Bindung an das rb-Protein nicht geändert. Hiermit kann auch weitgehend ausgeschlossen werden, daß das Protein bei der Bindung unter den vorliegenden Bedingungen eine chemische Änderung des Rifampicin-Moleküls katalysiert. Bei der Bindung des Antibiotikum-Moleküls an RNA-Polymerase konnte

(10) Dieser Versuch wurde nur mit spezifisch eluiertem rb-Protein durchgeführt, da dieses einer geringeren Denaturierungsgefahr während der Isolierung ausgesetzt war als das renaturierte rb-Protein.

im Gegensatz hierzu im UV-Bereich eine Rotverschiebung der Rifampicinabsorption um 10nm beobachtet werden (Wehrli, 1977).

Das Differenzspektrum (rb-Protein + Rif) - (Rif), das durch Differenzbildung zwischen den Extinktionswerten der Inkubationsmischung (rb-Protein + Rif) und denjenigen einer entsprechend konzentrierten Lösung des freien Rifampicin (Rif) berechnet werden kann, entspricht dem Spektrum des gebundenen Proteins. Jedoch auch hier muß angenommen werden, daß das Rifampicinspektrum infolge der Bindung des Antibiotikums an das Protein nicht verändert ist, da nur unter dieser Voraussetzung eine Aussage möglich ist. Der für das gebundene Protein berechnete Absorptionsverlauf unterscheidet sich, wie zu erwarten, im sichtbaren Bereich nicht von dem des freien Proteins. Jedoch zeigt sich im Bereich von 250-290nm eine um ca.15% erhöhte Extinktion und im Bereich von 300-350nm eine um 100% erhöhte Extinktion gegenüber der des freien Proteins (Abb.21b). Während der geringen Abweichung im Bereich von 250-290nm wahrscheinlich Konzentrationsdifferenzen der vermessenen Lösungen zugrundeliegen, liegt die Differenz im Bereich von 300-350nm eindeutig außerhalb eines Fehlers. Sie ist Ausdruck einer Wechselwirkung des Proteins mit Rifampicin und wohl auf eine Verschiebung der Absorption der Aminosäuren Tryptophan oder Tyrosin nach längeren Wellenlängen zurückzuführen. Die gewählte Betrachtungsweise unterliegt jedoch der oben beschriebenen Annahme, daß sich das Rifampicinspektrum infolge der Bindung an rb-Protein nicht ändert, und läßt es nicht zu, durch eine Bindung hervorgerufene additive Änderungen in den Absorptionseigenschaften von Rifampicin oder rb-Protein festzustellen.

Mit anderen Methoden konnte in verschiedenen Fällen, z.B. bei der Bindung von Rifampicin an RNA-Polymerase (Bähr et al., 1976) oder bei der Bindung der spezifischen Substrate an bindende periplasmatische Proteine (Boos, 1974), gezeigt werden, daß die Bindungsänderungen in der Tryptophanfluoreszenz der Proteine zur Folge hat.

2. Elektrophoretisches Verhalten des rb-Proteins nach Inkubation mit Rifampicin

Neben einer Änderung der Lichtabsorptionseigenschaften besteht bei Proteinen mit spezifischem Bindungsverhalten für gewisse Substrate die Möglichkeit, daß eine durch Bindung des Substrates

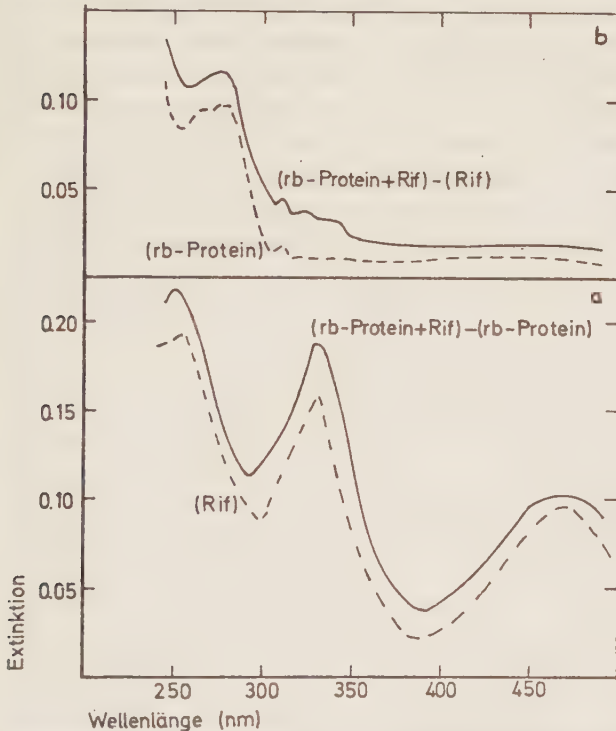


Abb.21

Vergleich der Spektren von rb-Protein und Rifampicin im freien und gebundenen Zustand

Eine Lösung des spezifisch eluierten Proteins (vgl.Kap.1.2.) mit 0.5mg Protein/ml ($= 1.4 \cdot 10^{-5}M$) wurde in Gegenwart von $0.7 \cdot 10^{-5}M$ Rifampicin in Puffer F 14h bei $4^{\circ}C$ inkubiert. Lösungen von freiem Protein bzw. Rifampicin besaßen gleiche Konzentrationen in Puffer F. Der Absorptionsverlauf aller 3 Lösungen wurde bei Raumtemperatur am Zeiss-Spektralphotometer PMQ II jeweils gegen Puffer F gemessen. Die Spektren von gebundenem Protein bzw. Rifampicin wurden durch Differenzbildung zwischen den Extinktionswerten der Inkubationsmischung $(rb-Protein + Rif)$ und der Lösungen von freiem Rifampicin (Rif) bzw. $rb-Protein$ $(rb-Protein)$ bei gleicher Wellenlänge berechnet (vgl.Text).

bewirkte Konformationsumwandlung die elektrophoretische Beweglichkeit des Proteins beeinflusst.

a spezifisch eluiertes Protein

Wurde spezifisch eluiertes rb-Protein in einer Konzentration von 0.12mg/ml Puffer C (0.15M KCl) in Gegenwart der relativ hohen Rifampicinkonzentration von 0.7mM inkubiert, so konnten bei der anschließenden Disc-Elektrophorese zwei Proteinbanden mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit und einem relativen Mengenverhältnis der schneller (a) zu der langsamer wandernden Bande (b) von 9:1 beobachtet werden (Abb.22 und 23).

Im Gel mit 7.5% Acrylamid entsprechen die schneller und die langsamer wandernde Bande in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit den beiden ohne vorherige Inkubation in Anwesenheit von Rifampicin auftretenden Banden des rb-Proteins (vgl.Abb.7), die dem Dimeren

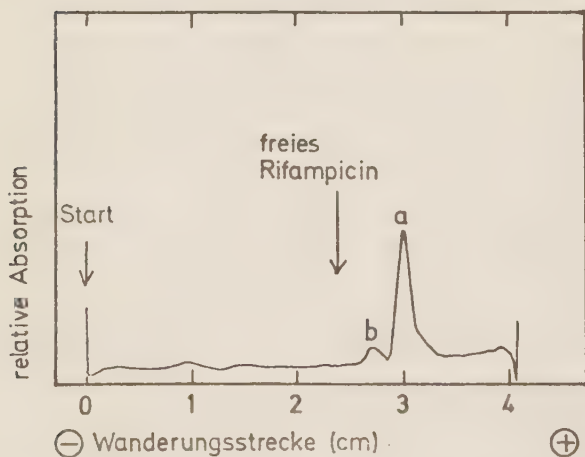


Abb.22

Disc-Elektrophorese von rb-Protein nach Inkubation in Gegenwart von Rifampicin

Spezifisch eluiertes rb-Protein (vgl.Kap.I.2.; 5.9 μ g) wurde bei einer Konzentration von 0.12mg Protein/ml Puffer C ($= 3.3 \cdot 10^{-6}$ M) in Gegenwart von 0.7mM Rifampicin 1h bei 25°C inkubiert. Vor dem Auftragen wurde die Lösung 1:1 mit Probenpuffer verdünnt. Elektrophorese vgl.Kap.5.3.

bzw. Tetrameren zugehören (vgl. Abb. 17). Dieses Ergebnis läßt es jedoch nicht ohne weiteres zu, die beiden nach Inkubation in Anwesenheit von Rifampicin auftretenden Banden dem dimeren bzw. tetrameren Protein zuzuordnen, da die elektrophoretische Beweglichkeit eines Proteins im Polyacrylamidgel sowohl durch die Größe als auch durch seine Ladungsdichte bestimmt wird. Die Molekulargewichtskontrolle mit Hilfe der Disc-Elektrophorese in Gelen verschiedener Acrylamidkonzentrationen (vgl. Kap. III.3.2.) ergab für die schneller wandernde Bande ein Molekulargewicht von 35 000 und für die langsamer wandernde Bande ein Molekulargewicht von 74 000 (Eichkurve vgl. Abb. 17; Zusammensetzung der auf die Gele aufgetragenen Proteinlösungen und Inkubationsbedingungen vgl. Legende zu Abb. 22) und bestätigte die Vermutung, daß es sich bei den beiden Banden um dimeres bzw. tetrameres rb-Protein handelt. Da diese beiden Banden sowohl in ihrer Größe als auch in der elektrophoretischen Beweglichkeit in Gelen mit 3.75%-11.25% Acrylamid mit den Banden identisch sind, die auch ohne vorherige Inkubation in Anwesenheit von Rifampicin auftreten, müssen sie auch die gleiche Ladung wie diese besitzen (Hedrick and Smith, 1968). So kann ausgeschlossen werden, daß das dimere rb-Protein durch Bindung von Rifampicin eine Konformationsumwandlung erfährt, die sich auf die Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche auswirkt. Eine solche Beobachtung wird für das periplasmatische, galaktosebindende Protein berichtet, das durch Bindung von Galaktose eine Konformationsumwandlung erfährt, die sich in veränderter elektrophoretischer Beweglichkeit infolge einer Änderung der Ladungsdichte äußert (Boos et al., 1972).

Jedoch tritt bei einer Konzentration an rb-Protein von 0.12mg/ml, bei der nach Inkubation in Gegenwart von 0.15M KCl und in Abwesenheit von Rifampicin keine Aggregation beobachtet wird (vgl. Abb. 19), nach Inkubation in Gegenwart eines hohen molaren Überschusses an Rifampicin (ca. 200fach) tetrameres Protein auf, nicht aber bei darunterliegenden Konzentrationen an Rifampicin. Dies ist insofern bemerkenswert, als die Rifampicinkonzentration während der Elektrophorese im Gel wesentlich kleiner sein muß als in der Inkubationsmischung, da freies Rifampicin im Gel langsamer wandert als die beiden Proteinbanden (vgl. Abb. 22), und infolge-

dessen der vorliegende Rifampicinüberschuß schon nach kurzer Elektrophoresezeit von den Proteinbanden abgetrennt sein muß und das Gleichgewicht nicht mehr beeinflussen kann. Aus der Beobachtung, daß unter dieser Voraussetzung trotzdem Tetramer im Gel zu beobachten ist, ist zu schließen, daß Rifampicin erst ab einer bestimmten Konzentration die Bildung von Tetramer bewirkt und unter den Bedingungen der Elektrophorese eine äußerst langsame Rückbildung des Dimeren erfolgt. Im Rahmen dieses Versuches kann nicht entschieden werden, ob während der Inkubation erst in Gegenwart der sehr hohen Rifampicinkonzentration von 0.7mM möglicherweise irreversible Tetramerbildung erfolgt, und deshalb die Abtrennung von Rifampicin im Gel keine Bedeutung mehr hat, oder ob das Antibiotikum während der Elektrophorese in hohem Überschuß fest an das Protein gebunden sein muß, möglicherweise

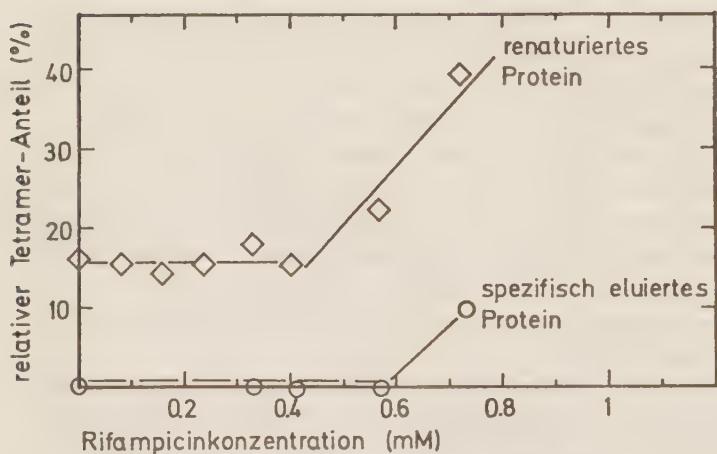


Abb.23

Tetrameranteil des rb-Proteins in Abhängigkeit von der Rifampicinkonzentration in der Inkubationsmischung

Renaturiertes oder spezifisch eluiertes rb-Protein wurde bei einer Konzentration von 0.12mg/ml Puffer C ($= 3.3 \cdot 10^{-6}M$) in Gegenwart von 0-0.7mM Rifampicin 1h bei 25°C inkubiert und vor der Elektrophorese auf Disc-Gelen 1:1 mit Probenpuffer verdünnt. Es wurden jeweils 5.9µg auf ein Gel aufgetragen. Elektrophorese vgl. Methoden, Kap.5.3.

Der relative Tetrameranteil wurde jeweils durch planimetrische Auswertung bestimmt.

kovalent, um Aggregation bewirken zu können. Aufgrund der zur Tetramerbildung notwendigen, sehr hohen Rifampicinkonzentrationen ist kaum anzunehmen, daß hier ein spezifischer Einfluß im üblichen Sinne vorliegt.

b renaturiertes Protein

Das durch Harnstoffelution gewonnene, renaturierte rb-Protein zeigt bereits nach Inkubation in Abwesenheit von Rifampicin (Puffer C, 0.15M KCl) die langsamer wandernde, dem Tetramer entsprechende Bande, deren relative Intensität ab einer Konzentration von etwa 0.4mM Rifampicin im Inkubationsgemisch stetig zunimmt (Abb.23). Der konstante Prozentsatz an Tetramer bei Rifampicinkonzentrationen $< 0.4\text{mM}$ ist nicht auf eine Einwirkung des Antibiotikums zurückzuführen, da diese Bande bei der vorliegenden Proteinkonzentration auch nach Inkubation in Abwesenheit von Rifampicin unter sonst gleichen Bedingungen im Gel zu beobachten ist (vgl. Abb.18). Ihre Bildung ist wahrscheinlich eine Folge der Konzentrierung während der Elektrophorese (vgl.Kap.III.3.2.).

Im Vergleich mit dem spezifisch eluierten rb-Protein setzt beim renaturierten rb-Protein vermehrte Tetramerbildung bereits bei Inkubation in Gegenwart niedrigerer Rifampicinkonzentrationen ein, sodaß auch hier die wohl auf Denaturierungserscheinungen beruhende, erhöhte Aggregationstendenz des renaturierten Proteins deutlich wird.

V. Affinität des rb-Proteins zu Rifampicin - Ermittlung der Dissoziationskonstanten durch Gleichgewichtsdialyse

Vorhergehende Versuche haben gezeigt, daß sowohl die Wiederbindung des mit Harnstofflösung desorbierten und renaturierten rb-Proteins an Rifampicin-Sepharose wie auch eine spezifische Desorption des Proteins von Rifampicin-Sepharose mit Rifampicin möglich ist. Daraus und aus dem Einfluß der Rifampicinbindung auf die Lichtabsorptionseigenschaften (vgl.Kap.IV.1.) kann auf eine spezifische Bindungsaffinität des Proteins für Rifampicin geschlossen werden, die im folgenden mit Hilfe der Gleichgewichts-

dialyse quantitativ in Form der Dissoziationskonstanten K_D des Protein- [^3H]Rifampicin-Komplexes bestimmt werden soll.

Die Gleichgewichtsdialyse wurde in einer Mikroapparatur nach Englund et al. (1969) durchgeführt. Man geht hierbei von gleichen Volumina einer Lösung des bindenden Proteins und des zu bindenden Liganden aus, die sich in durch eine für den Liganden permeable Dialysemembran getrennten Kammern befinden. Von verschiedenen Ligandenkonzentrationen ausgehend, werden nach Einstellung des Gleichgewichts in beiden Kammern die Gleichgewichtskonzentrationen des Liganden bestimmt, aus denen die Dissoziationskonstante und die Anzahl der Bindungsstellen nach einer von Scatchard (1949) auf der Grundlage des Massenwirkungsgesetzes entwickelten Methode ermittelt werden können (vgl. Methoden, Kap. 12.2.).

In Vorversuchen wurde ein zur Gleichgewichtseinstellung notwendiger Zeitraum von 10h ermittelt und sichergestellt, daß das rb-Protein über diesen Zeitraum ohne Denaturierungserscheinungen bleibt (vgl. Methoden, Kap. 12.3. und 12.4.).

Die Genauigkeit der durch Gleichgewichtsdialyse ermittelten Konstanten hängt wesentlich von der Größenordnung der noch verlässlich zu bestimmenden Konzentrationen des Liganden und damit von dessen spezifischer Radioaktivität ab. Gleichgewichtsdialysen mit RNA-Polymerase aus E. coli, welche Rifampicin mit einer Gleichgewichtskonstanten von $3.3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ bei 37°C bindet (Wehrli et al., 1976), ergaben, daß mit dem zur Verfügung stehenden [^3H]Rifampicin ($8\,900 \text{ IpM/nmol}$) nur Dissoziationskonstanten $> 10^{-6} \text{ M}$ erfaßt werden können (vgl. Methoden, Kap. 12.6.), und sich ergebende Konstanten der Größenordnung 10^{-6} mit anderen Methoden zu überprüfen sind.

Für die Auswertung der Daten nach Scatchard (1949) sind Messungen über einen möglichst weiten Sättigungsbereich des Proteins notwendig. Da jedoch nach Deranleau (1969) Messungen bei 20-80%iger Sättigung des Proteins durch den Liganden die verlässlichsten Werte ergeben, erhielten Meßpunkte außerhalb dieses Bereiches ein geringeres Gewicht bei der Berechnung der Regressionsgeraden in der Auftragung nach Scatchard (vgl. Methoden, Kap. 12.5.).

Nach Klärung dieser methodischen Fragen wurden die Gleichgewichtskonstanten sowohl des spezifisch mit Rifampicin eluierten rb-Proteins als auch des renaturierten rb-Proteins ermittelt. Nach dem Massenwirkungsgesetz kann die Dissoziationskonstante nach Gleichung (4) berechnet werden:

$$K_D = \frac{[P_f] \cdot [Rif_f]}{[P-Rif]} = \frac{[P_t - P-Rif] \cdot [Rif_f]}{[P-Rif]} \quad (4)$$

mit $\begin{cases} [P_f] \\ [P_t] \end{cases}$ = Konzentration an freiem Protein
 $\begin{cases} [P_t] \\ [P-Rif] \end{cases}$ = Gesamtproteinkonzentration
 $[P-Rif]$ = Konzentration an proteingebundenem $[^3H]$ Rifampicin
 $[Rif_f]$ = Konzentration an freiem $[^3H]$ Rifampicin

Hieraus geht hervor, daß für eine Berechnung die molaren Konzentrationen wichtig sind, und deshalb das Molekulargewicht sowohl des freien Proteins als auch des Protein-Rifampicin-Komplexes bekannt sein müssen. Da gezeigt werden konnte, daß das rb-Protein in Gegenwart von Rifampicin zur Tetramerbildung neigt (vgl. Kap.IV.2.), mußte zuvor das Molekulargewicht des Proteins unter den bei der Gleichgewichtsdialyse vorliegenden Bedingungen bestimmt werden.

a spezifisch eluiertes Protein

Eine Untersuchung durch Zentrifugation im Sucrosedichtegradienten, bei der Lösungen des spezifisch eluierten rb-Proteins eingesetzt wurden, die bei einer Proteinkonzentration von 0.78mg/ml in Puffer C in Gegenwart von $1.5 \cdot 10^{-4}M$ und $4.2 \cdot 10^{-4}M$ Rifampicin inkubiert worden waren (6h bei $25^\circ C$), und bei der die Sucrosegradienten das Antibiotikum in den gleichen Konzentrationen enthielten, ergab, daß das rb-Protein im Rahmen der Nachweisgrenze unter diesen Bedingungen vollständig als Dimeres vorliegt (Durchführung. mit Ausnahme der oben angegebenen Parameter, und Belege vgl. Abb.20) (11).

(11) Dies ging schon aus Untersuchungen in Discgelen für eine Proteinkonzentration $\leq 0.12mg/ml$ hervor (vgl. Abb.23).

Bis zu der genannten Proteinkonzentration kann also das rb-Protein in Gegenwart von bis zu $4.2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Rifampicin unter den gewählten Bedingungen, die denen in der Gleichgewichtsdialyse entsprechen, als Dimeres mit einem Molekulargewicht von 36 500 in die Berechnungen eingehen. Für Rifampicin wird angenommen, daß es bis zu hier verwandten Konzentrationen monomer vorliegt.

Für die Gleichgewichtsdialysen wurden eine Proteinkonzentration von 0.75 mg/ml und 6 verschiedene Rifampicinkonzentrationen zwischen $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ und $4.2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ gewählt. Aus der Steigung der berechneten Regressionsgeraden im Scatchard-Diagramm ergibt sich eine Dissoziationskonstante $K_D = 2.4 \cdot 10^{-4} \pm 0.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ und aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse ergeben sich 1.8 ± 0.4 Bindungsstellen pro Dimer des rb-Proteins (Abb.24).

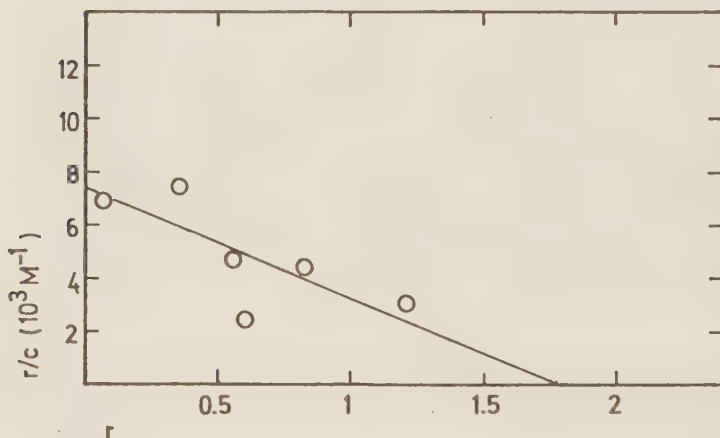


Abb.24

Scatchard-Diagramm für spezifisch eluiertes rb-Protein

Es wurden Gleichgewichtsdialysen bei einer Proteinkonzentration von 0.75 mg/ml ($= 21.4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) und Rifampicinkonzentrationen von $1 \cdot 10^{-5}$ bis $4.2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ durchgeführt. Durchführung und Auswertung vgl. Methoden, Kap.12.)

Regressionsgerade: $y(x) = -4\,150x + 7\,400$

Nulldurchgang: $x = 1.78$

Korrelation: $k = -0.67$

$$K_D = -\frac{1}{\text{tg} \alpha} = \frac{1}{4\,150} = 2.4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

Die Frage, ob in dieser Präparation enthaltene Polyäthylenglykol-Verunreinigungen (vgl.Fußnote 7, S.48) ein verfälschtes Ergebnis hervorrufen können, wurde durch Gleichgewichtsdialyse mit Rinderserumalbumin ohne und mit Polyäthylenglykol-Verunreinigungen zu klären versucht. Rinderserumalbumin, das aufgrund seiner Transportfunktionen im Blut Bindungseigenschaften für die verschiedensten Substanzen aufweist, bindet auch Rifampicin und ist deshalb zu einem solchen Vergleich gut geeignet. Es konnte kein Unterschied in der Rifampicinbindung der beiden Rinderserumalbumin-Präparationen festgestellt werden (vgl.Methoden,Kap.12.7.). Somit besteht kein Grund für die Annahme, daß diese Verunreinigungen, die die Proteinbestimmung stören (vgl.Methoden, Kap.6.), einen entscheidenden Einfluß auf die Ergebnisse der Gleichgewichtsdialyse mit rb-Protein besitzen.

b renaturiertes Protein (dimerer Zustand)

Da dieses Protein durch Denaturierung mit Harnstoff von Rifampicin-Sepharose desorbiert wurde, handelt es sich um ein in nicht bekanntem Maße renaturiertes Protein, das möglicherweise eine veränderte Bindungsaffinität oder -stöchiometrie aufweisen kann. Die Zentrifugation im Sucroседichtegradienten in Anwesenheit von Rifampicin ergab in Übereinstimmung mit dem spezifisch eluierten Protein, daß bei Konzentrationen bis zu 0.78mg Protein/ml und $4.2 \cdot 10^{-4}M$ Rifampicin das Protein unter den Bedingungen der Gleichgewichtsdialyse vollständig als Dimer vorliegt (Durchführung vgl.Angaben in Kap.V. für spezifisch eluiertes Protein)⁽¹²⁾ und als solches in den genannten Konzentrationsbereichen mit einem Molekulargewicht von 36 500 in die Berechnungen eingehen kann. Liegen Protein- oder Rifampicinkonzentration höher, so muß mögliche Assoziation zum Tetrameren berücksichtigt werden. Unter Einhaltung der bei der Dichtegradienten-Zentrifugation gewählten, höchsten Konzentrationen für Protein (0.78mg/ml) und

⁽¹²⁾ Dies ist ein weiterer Beweis für die Vermutung, daß der beim renaturierten Protein in Gelen immer auftretende, konstante Prozentsatz an tetramerem Protein von ca.10% auf Konzentrierung während der Elektrophorese und nachfolgende Tetramerbildung im Gel zurückzuführen ist (vgl.Kap.III.3.2. und IV.2.).

Rifampicin ($4.2 \cdot 10^{-4} \text{M}$) wurden Gleichgewichtsdialysen bei einer Proteinkonzentration von 0.77mg/ml und Rifampicinkonzentrationen von $5 \cdot 10^{-6}$ bis $4.2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ durchgeführt.

Aus der Steigung der Regressionsgeraden im Scatchard-Diagramm folgt eine Dissoziationskonstante $K_D = 0.97 \cdot 10^{-4} \pm 0.2 \cdot 10^{-4} \text{M}^{(13)}$.

Aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse ergeben sich 0.86 ± 0.2 Bindungsstellen pro Dimer des rb-Proteins (Abb.25).

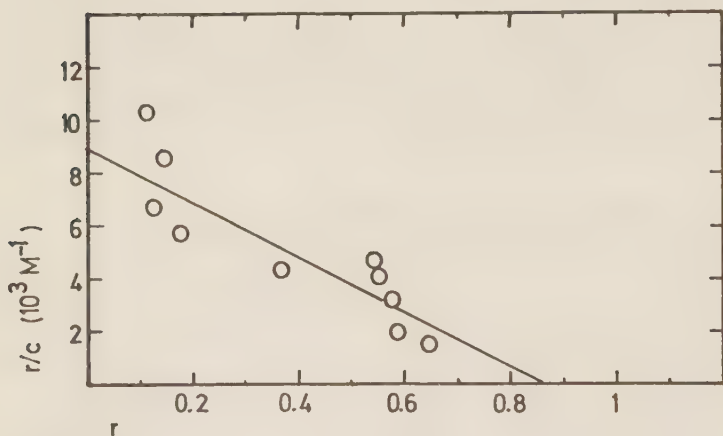


Abb.25

Scatchard-Diagramm für renaturisiertes rb-Protein (dimerer Zustand)

Es wurden Gleichgewichtsdialysen bei einer Proteinkonzentration von 0.77mg/ml ($= 22 \cdot 10^{-6} \text{M}$) und Rifampicinkonzentrationen von $5 \cdot 10^{-6}$ bis $4.2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ durchgeführt. Durchführung und Auswertung vgl. Methoden, Kap. 12.)

Regressionsgerade: $y(x) = -10\,330x + 8\,935$

Nulldurchgang: $x = 0.86$

Korrelation: $k = -0.87$

$$K_D = -\frac{1}{\text{tg } \alpha} = \frac{1}{10\,330} = 0.97 \cdot 10^{-4} \text{M}$$

(13) Meßpunkte mit renaturisiertem rb-Protein, nachdem die Proteinlösung 12 Monate bei -20°C gelagert worden war, lagen auf dieser Geraden, was auf eine durch die Lagerung unveränderte Affinität hinweist.

Zieht man in Betracht, daß sich nur etwa 75% des renaturierten Proteins erneut an Rifampicin-Sepharose binden lassen (vgl. Kap.I.1.4.), so ergeben sich für den Anteil an noch bindendem, "aktivem" Protein bei der Gleichgewichtsdialyse 1.1 ± 0.2 Bindungsstellen pro Dimer; die Dissoziationskonstante ändert ihren Wert nicht.

c renaturiertes Protein (teilweise tetramerer Zustand)

Um zu überprüfen, ob die Assoziation des Proteins zum Tetrameren einen meßbaren Einfluß auf die Bindungsaffinität oder -stöchiometrie gegenüber Rifampicin hat, wurden Bedingungen für die Gleichgewichtsdialyse gewählt, unter denen nach den Ergebnissen bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese (vgl.Abb.18 und 23) bereits stärkere Assoziation zum Tetrameren auftritt (Tab.6).

Tab.6

AbSchätzung des Anteils an tetramerem rb-Protein bei verschiedenen Protein- und Rifampicinkonzentrationen

Der Tetrameranteil des renaturierten rb-Proteins nach Inkubation in Puffer C (0.15M KCl) und in Abwesenheit von Rifampicin (Spalte 3) ergab sich durch planimetrische Auswertung von Disc-Gelen bzw. durch Extrapolation der erhaltenen Abhängigkeit von der Proteinkonzentration auf die höhere Konzentration von 6.9mg/ml (vgl.Abb.18a). Nach Inkubation in Gegenwart von Rifampicin unter den Bedingungen der Gleichgewichtsdialyse nimmt der Tetrameranteil ab einer Rifampicinkonzentration von 0.4mM um 7% zu, wenn die Rifampicinkonzentration um 0.1mM ansteigt (vgl.Abb.23). Zur AbSchätzung des Tetrameranteils bei verschiedenen Rifampicinkonzentrationen wurden deshalb für eine Zunahme der Rifampicinkonzentration um 0.1mM jeweils 7% zum bereits vorliegenden Tetrameranteil addiert.

Die Symbole in Spalte 6 beziehen sich auf Abb.26.

Konzentration an rb-Protein (mg/ml)	Konzentration an Rifampicin (M)	Tetrameranteil in (%) bei einer Rifampicin- konzentration von			
		-	$7.5 \cdot 10^{-4}M$	$1 \cdot 10^{-3}M$	
2.3	$1 \cdot 10^{-4}$ - $7.5 \cdot 10^{-4}$	25	≥ 60	-	○
6.9	$5 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-3}$	≥ 30	-	≥ 80	◇

Bei der Auswertung der Meßergebnisse wurde zur Vereinfachung angenommen, daß das gesamte Protein als Tetramer vorliegt, und dessen molare Konzentration bei der Berechnung eingesetzt. Die sich hieraus ergebenden Resultate können also nur als Näherung aufgefaßt werden.

Aus der Auftragung nach Scatchard ergibt sich eine Dissoziationskonstante $K_D = 1.1 \cdot 10^{-4} \pm 0.2 \cdot 10^{-4} M$, der Schnittpunkt mit der Abszisse zeigt 1.8 ± 0.4 Bindungsstellen an (Abb.26). Die Bindungsstöchiometrie erhöht sich unter Berücksichtigung des Anteils von 75% an "aktivem" rb-Protein (vgl.Kap.I.1.4.) auf 2.4 ± 0.5 Bindungsstellen pro Tetramer.

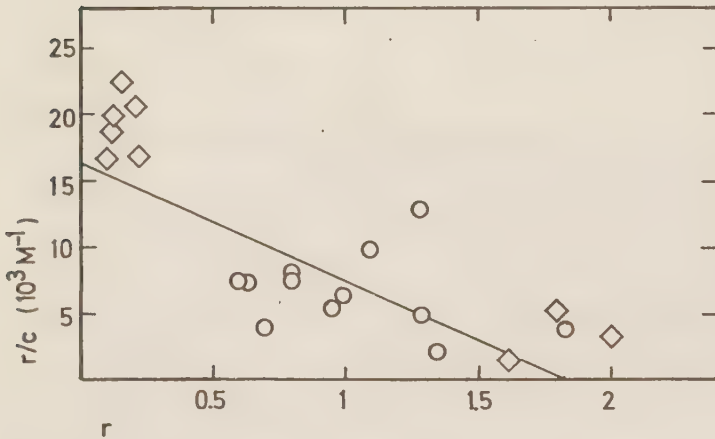


Abb.26

Scatchard-Diagramm für renaturisiertes rb-Protein
(teilweise tetramerer Zustand)

Es wurden Gleichgewichtsdialysen bei Proteinkonzentrationen von 2.5mg/ml ($= 66 \cdot 10^{-6} M$) und 6.9mg/ml ($= 197 \cdot 10^{-6} M$) und Rifampicin-konzentrationen von $5 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3} M$ durchgeführt. Durchführung und Auswertung vgl. Methoden, Kap.12.).

Symbole ○ und ◇ vgl. Tab.6

Regressionsgerade: $y(x) = -8\,870x + 16\,206$

Nulldurchgang: $x = 1.82$

Korrelation: $k = -0.80$

$$K_D = -\frac{1}{\lg \alpha} = \frac{1}{8\,870} = 1.1 \cdot 10^{-4} M$$

d vergleichende Betrachtung

Die für das spezifisch eluierte und für das renaturierte rb-Protein ermittelten Dissoziationskonstanten zeigen unter Berücksichtigung der Fehlerbreite von 20% (vgl. Methoden, Kap. 12.5.) eine für die beiden Proteinpräparationen vergleichbare Bindungsaffinität für Rifampicin an. Das Dimere des rb-Proteins bindet also unabhängig von der Art der Isolierung Rifampicin mit einer mittleren Dissoziationskonstanten

$$K_D = 1.7 \cdot 10^{-4} \pm 0.3 \cdot 10^{-4} M$$

in Puffer C (0.15M KCl) bei 25°C.

Aus dem Vergleich der Dissoziationskonstanten von dimer und großenteils tetramer vorliegendem, renaturiertem rb-Protein folgt, daß die Assoziation zum Tetrameren ebenfalls keinen meßbaren Einfluß auf die Bindungsaffinität hat.

Bei der Ermittlung der Bindungsstöchiometrie ergaben sich für das renaturierte Protein 1.1 ± 0.2 Bindungsstellen pro Dimer, während tetramer vorliegendes, renaturiertes Protein 2.4 ± 0.5 Bindungsstellen für Rifampicin besitzt, woraus sich 1.2 ± 0.2 Bindungsstellen pro Dimer berechnen lassen. Die Bindungsstöchiometrie des renaturierten Proteins wird durch Assoziation zum Tetrameren also ebenfalls nicht verändert. Für das spezifisch eluierte Protein ergaben sich 1.8 ± 0.4 Bindungsstellen pro Dimer. Das Dimere des rb-Proteins besteht aus zwei gleich großen Polypeptidketten (vgl. Kap. III.3.). Da im Falle des renaturierten Proteins nur eine Rifampicin-Bindungsstelle pro Dimer ermittelt wurde, liegt es nahe, für dieses Protein die Existenz gleich großer, jedoch im Bindungsverhalten für Rifampicin nicht identischer Polypeptidketten anzunehmen. Dagegen weist das beim spezifisch eluierten Protein erhaltene Ergebnis auf vergleichbare Bindungseigenschaften der zwei Polypeptidketten für Rifampicin hin, was möglicherweise auf die im Vergleich zum harnstoffeluierten, renaturierten Protein schonendere, spezifische Art der Isolierung durch Desorption mit Rifampicin zurückzuführen ist.

VI. Lokalisation des rb-Proteins in der E.coli-Zelle

- Untersuchung durch osmotischen Schock -

Die vorausgegangenen Untersuchungen haben gezeigt, daß das isolierte Protein ein spezifisch Rifampicin bindendes Protein ist. Eine wichtige Frage im Zusammenhang mit der möglichen Bedeutung des Proteins für die E.coli-Zelle ist die Frage nach seiner Lokalisation. E.coli gehört zu den gramnegativen Bakterien und besitzt eine Zellhülle, die aus einer inneren sowie einer äußeren Membran und dem dazwischen liegenden periplasmatischen Raum besteht, der die löslichen periplasmatischen Proteine enthält (Heppel, 1969).

Periplasmatische Proteine können in hoher Ausbeute durch den kalten osmotischen Schock nach Neu und Heppel (1965) freigesetzt werden und dadurch von cytoplasmatisch vorkommenden Proteinen unterschieden werden. Im folgenden wurde untersucht, ob rb-Protein durch den osmotischen Schock aus E.coli B freigesetzt werden kann.

Zur Vorbereitung des osmotischen Schocks werden Bakterienzellen, die sich im exponentiellen Wachstumsstadium befinden, in 0.5M Sucroslösung mit 10^{-4} M EDTA suspendiert. Durch Wasserabgabe schrumpft der cytoplasmatische Raum, und gleichzeitig löst sich infolgedessen die Cytoplasmamembran vom äußeren Teil der Zellhülle. Dieser Vorgang wird als Plasmolyse bezeichnet (Heppel, 1969). Die Anwesenheit von EDTA bewirkt die Freisetzung von Lipopolysaccharid und eine erhöhte Permeabilität der Membran (Leive, 1968; Leive et al., 1968). Unterwirft man die Zellen in diesem Zustand dem osmotischen Schock, indem man sie schnell in sucrosefreier, verdünnter $MgCl_2$ -Lösung ($0^{\circ}C$) suspendiert, schwillt der Protoplast sofort wieder auf sein ursprüngliches Volumen an und bewirkt so die selektive Abgabe von periplasmatischen Bestandteilen durch die äußere Membran ins Medium (Heppel, 1969). Der beim Abzentrifugieren der Zellen erhaltene Überstand, der als Schockflüssigkeit bezeichnet wird, enthält die löslichen, periplasmatischen Proteine.

Der osmotische Schock ist häufig von unerwünschter Zellyse und Abgabe auch cytoplasmatischer Proteine ins Medium begleitet. Deshalb ist eine Überprüfung auf selektive Abgabe von periplasmatischem Protein notwendig, die nach mehreren Methoden vorgenommen wurde:

1. Die Menge an periplasmatischem Protein, die durch den osmotischen Schock freigesetzt werden kann, entspricht etwa 4% des gesamten zellulären Proteins von E.coli (Nossal and Heppel, 1966). Der Proteingehalt in der Schockflüssigkeit einer bekannten Menge von Zellen bietet deshalb beim Vergleich mit dem Gesamtproteingehalt der gleichen Menge an Zellen einen Anhaltspunkt für das Maß an Zellyse.
2. In der Schockflüssigkeit anhand ihrer Aktivität nachzuweisende β -Galaktosidase, die ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert ist, kann ebenfalls als Maß für erfolgte Zellyse herangezogen werden, indem man die vorhandene Enzymaktivität mit derjenigen vergleicht, die im Ultraschallaufschluß einer entsprechenden Menge von ganzen Zellen gemessen wird (Nossal and Heppel, 1966). Aus diesem Grund wurden die E.coli-Zellen zur Schockbehandlung auf Glycerin anstelle von Glucose als Kohlenstoffquelle gezogen. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Synthese von β -Galaktosidase durch Zugabe von Laktose induziert.
3. In der Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese kann das Auftreten von cytoplasmatischem Protein in der Schockflüssigkeit anhand einer charakteristischen Bande wie z.B. der $\beta\beta'$ -Untereinheiten der RNA-Polymerase (E.C.2.7.7.6.) leicht erkannt werden.

Bei beiden Teilschritten des Schockverfahrens, der Plasmolyse der Zellen in konzentrierter Rohrzuckerlösung sowie dem eigentlichen osmotischen Schock beim Suspendieren der plasmolysierten Zellen in verdünnter $MgCl_2$ -Lösung, wird die Abgabe von Protein beobachtet. Während beim osmotischen Schock neben anderem im UV-Bereich absorbierendem Material hauptsächlich periplasmatisches Protein freigesetzt wird (Neu and Heppel, 1965), wird bei der Plasmolyse zusammen mit Lipopolysaccharid und Lipiden nur wenig Protein abgegeben, das wahrscheinlich mit diesen Komponenten an

der Zelloberfläche assoziiert ist (Leive et al., 1968).

Ergab die Überprüfung nach den oben beschriebenen Methoden keinen Anhaltspunkt für wesentliche Zellyse, so konnte selektive Abgabe von periplasmatischem bzw. in der Zellhülle lokalisiertem Protein angenommen werden. In diesem Fall wurde mit Hilfe der Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese die Zusammensetzung des Plasmolyse-Überstandes und der Schockflüssigkeit näher, insbesondere auf Anwesenheit von rb-Protein untersucht.

1. E.coli B (Wildtyp)

a Plasmolyse-Überstand

Im Überstand der plasmolysierten Zellen konnten weder β -Galaktosidase-Aktivität noch, anhand des Dodecylsulfat-Polyacrylamidgels, die Untereinheiten der RNA-Polymerase festgestellt werden (Tab.7; Abb.27). Die Abgabe von cytoplasmatischem Protein infolge unerwünschter Zellyse in diesem Stadium ist also auszuschließen. Aus diesem Grund muß die bei der Plasmolyse abgegebene Proteinmenge, die rechnerisch 2.2% des gesamten zellulären Proteins entspricht (Tab.7), ausschließlich aus in der Zellhülle lokalisiertem Protein bestehen.

Nach der planimetrischen Auswertung des Dodecylsulfat-Polyacrylamidgels stellt die dem rb-Protein entsprechende Bande einen Anteil von 1.5% des bei der Plasmolyse abgegebenen Proteins dar und liegt damit etwa 7fach angereichert gegenüber einer Lösung des gesamten zellulären Proteins vor, die 0.2% rb-Protein enthält (Abb.27).

Der Hauptanteil ($>50\%$) der abgegebenen Proteinmenge jedoch besteht aus einer Bande, die einem Polypeptid mit dem Molekulargewicht $34\,000 \pm 4\,000$ entspricht (Abb.27). Da in diesem Überstand weder β -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden konnte noch RNA-Polymerase-Untereinheiten auftreten, ist auch nicht anzunehmen, daß andere cytoplasmatische Proteine freigesetzt wurden, denen diese Bande zuzuordnen ist. In Verbindung mit dem Proteinmuster von Membranpräparationen (vgl. Abb.28) kann diese starke Bande den Hauptproteinen der äußeren Zellhüllmembran Ia, Ib und II* (Hindennach and Henning, 1975) zugeordnet werden, deren Banden im Gel nicht aufgelöst sind. Außerdem ist das Hauptprotein III

der äußeren Membran (Hindennach and Henning, 1975) in einem relativen Anteil von 1.5% vorhanden. Diese Proteine gelten als integrale Membranproteine und können als solche normalerweise nur durch Behandlung mit Detergentien oder organischen Lösungsmitteln in Lösung gebracht werden (Hindennach and Henning, 1975). Im Falle des Proteins II* dürfte die unerwartete Löslichkeit darauf zurückzuführen sein, daß das Protein aufgrund seiner festen Assoziation mit Lipopolysaccharid (Schweizer and Henning, 1977) bei der Plasmolyse in Gegenwart von EDTA zusammen mit Lipopolysaccharid freigesetzt wird (Leive et al., 1968), und daß dieser Komplex relativ gut löslich ist (Schweizer et al., 1978). Ähnlich könnte auch die Abgabe der anderen Membranproteine zu erklären sein (14).

b Schockflüssigkeit

In der Schockflüssigkeit der Wildtypzellen betrug der Anteil der beim Schock abgegebenen Proteinmenge rechnerisch 2.2% des gesamten Zellproteins. Der Anteil an β -Galaktosidase-Aktivität, bezogen auf die Enzymaktivität in ganzen Zellen, betrug durchschnittlich 2% (Tab.7). Beim Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Werten (β -Galaktosidase-Aktivität $\leq 2\%$, freigesetzte Proteinmenge ca. 4% des Gesamtzellproteins; Nossal and Heppel, 1966) zeigt sich, gemessen an der β -Galaktosidase-Aktivität, eine ähnlich geringe Zellyse, jedoch ein niedrigerer Prozentsatz an in die Schockflüssigkeit abgegebenem Protein.

Neben der β -Galaktosidase-Aktivität wurde zur weiteren Überprüfung der selektiven Abgabe von periplasmatischem Protein der Anteil der $\beta\beta'$ -Untereinheiten der RNA-Polymerase im Protein der Schockflüssigkeit bestimmt. Nach der planimetrischen Auswertung des Dodecylsulfat-Polyacrylamidgels stellen die entsprechenden Banden einen Anteil von 0.1% des freigesetzten Proteins dar (Abb.27). Es wurden damit nur 0.13% der in den Zellen enthaltenen

(14) Diese Beobachtung könnte zur Isolierung der Membranproteine nach einem bisher noch nicht bekannten Verfahren genutzt werden, das neben der einfachen Handhabung auch den Vorteil besitzt, sehr schonend zu sein.

Menge der Untereinheiten $\beta\beta'$ in die Schockflüssigkeit abgegeben (15). Neben der geringen β -Galaktosidase-Aktivität von 2% zeigt dies eine nahezu selektive Abgabe von periplasmatischem Protein durch den osmotischen Schock an.

Tab.7

Ergebnisse des osmotischen Schocks für Wildtyp und $rpoB$ -Mutante

Der osmotische Schock wurde nach den Angaben in Methoden, Kap.13.1., die Berechnung der prozentualen β -Galaktosidase-Aktivität nach den Angaben in Kap.13.2. durchgeführt. Die in Schockflüssigkeit und Plasmolyse-Überstand abgegebenen Proteinmengen wurden jeweils prozentual auf die in der gleichen Menge von Zellen enthaltene Gesamtproteinmenge (110 μ g Protein/mg Zellen Feuchtgewicht) bezogen, die in einer Lösung von ganzen Zellen in dodecylsulfathaltigem Probenpuffer (vgl.Methoden, Kap.5.2.) bestimmt wurde. Die für den Wildtyp angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Versuchen, die für die Mutante angegebenen Werte Mittelwerte aus 5 Versuchen (1) bzw. Einzelwerte (2).

	β -Galaktosidase-Aktivität (%)		Anteil der abgegebenen Proteine am Gesamtzellprotein (%)	
<u>Wildtyp</u>				
ganze Zellen	100		-	
Plasmolyse-Überstand	0		2.2 ± 0.2	
Schock-flüssigkeit	2 ± 0.5		2.2 ± 0.2	
<u>$rpoB$-Mutante</u>	(1)	(2)	(1)	(2)
ganze Zellen	100	100	-	-
Plasmolyse-Überstand	0	0	0.5 ± 0.3	1
Schock-flüssigkeit	10 ± 3	2.6	11 ± 3	6.7

(15) Die Untereinheiten $\beta\beta'$ sind in einem Anteil von 1.5% am Gesamtzellprotein und von 0.1% in der in der Schockflüssigkeit befindlichen Proteinmenge enthalten (Abb.27). Da 2.2% des Gesamtzellproteins sich in der Schockflüssigkeit befinden (Tab.7), entspricht die dort enthaltene Menge an $\beta\beta'$ 0.002% (= 0.1% von 2.2%) des Gesamtzellproteins. Da im Gesamtzellprotein 1.5% $\beta\beta'$ enthalten sind, wurden also nur 0.13% $\beta\beta'$ freigesetzt.

Nachdem dieser wichtige Gesichtspunkt geklärt war, wurde untersucht, ob rb-Protein in dem in die Schockflüssigkeit abgegebenen Protein enthalten ist. Durch Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese konnte die dem rb-Protein entsprechende Bande im Polypeptidmuster der Schockflüssigkeit nachgewiesen und durch planimetrische Auswertung ein relativer Anteil an rb-Protein von 2% ermittelt werden (Abb.27) ⁽¹⁶⁾. Da der Anteil des rb-Proteins am gesamten, in ganzen Zellen enthaltenen Protein 0.2% beträgt (Abb.27), ist das rb-Protein also in der Schockflüssigkeit 10fach angereichert.

c Zellhüll- und Membranpräparationen von E.coli CR 34

Im Rahmen einer Untersuchung von Rifampicin-eindringungsresistenten Mutanten wurden von M.Tropschug (1977) Zellhüllen sowie innere und äußere Membran des Wildtyps E.coli CR 34 thy⁻F⁻ als auch einiger von diesem abstammenden Mutanten zur näheren Charakterisierung isoliert ⁽¹⁷⁾. Wurden die Zellhüllsuspensionen in Gegenwart von 1M KCl mit Ultraschall behandelt, und die lösliche Fraktion über eine Rifampicin-Sepharose-Säule gegeben, so konnte in allen Fällen rb-Protein zusammen mit anderen Proteinen adsorbiert und anschließend durch Harnstofflösung desorbiert werden (Tropschug, 1977). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte in den isolierten Zellhüllen des Wildtyps bei der Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese die dem rb-Protein entsprechende Bande nachgewiesen werden.

(16) Der Nachweis, daß die bezeichnete Proteinbande dem spezifisch an Rifampicin-Sepharose bindenden Protein entspricht, wurde am Beispiel der rpoB-Mutante geführt (vgl. Abschnitt rpoB-Mutante in Kap.VI.)

(17) Zellhüllen wurden nach Lugtenberg et al. (1975) durch Ultraschallbehandlung von Kulturen der logarithmischen Wachstumsphase und nachfolgende Zentrifugation bei 225 000g nach Abtrennung restlicher ganzer Zellen gewonnen. Innere und äußere Membranen wurden nach Osborn et al. (1972) isoliert. Hierbei wird durch Lyse von EDTA-Lysozym-Sphäroplasten eine Gesamtmembranfraktion gewonnen, die in einem isopyknischen Sucrosegradienten aufgrund von Dichteunterschieden in innere und äußere Membran aufgetrennt werden kann.

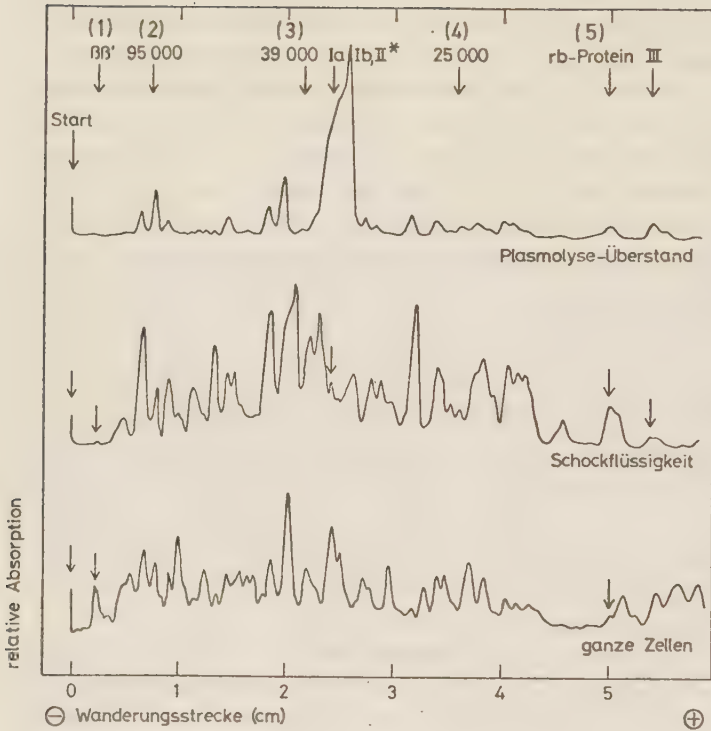


Abb.27

Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Plasmolyse-Überstand, Schockflüssigkeit und ganzen Zellen von E.coli B (Wildtyp)

Plasmolyse-Überstand und Schockflüssigkeit wurden gewonnen wie in Methoden, Kap.13. beschrieben; Konzentrierung der Lösungen für die Elektrophorese vgl. Methoden, Kap.5.2. Ganze Zellen desselben Kulturansatzes wurden in dodecylsulfathaltigem Probenpuffer gelöst. Es wurde jeweils das 18µg Protein entsprechende Volumen aufgetragen. Elektrophorese vgl. Methoden, Kap.5.2. Die Anteile der unten aufgeführten Proteine ergaben sich durch planimetrische Auswertung. Ia, Ib, II* und III vgl. Abb.28; Eichproteine vgl. Abb.12.

	Anteile am aufgetragenen Protein (%)			
	ββ'	rb-Protein	Ia, Ib, II*	III
Plasmolyse-Überstand	0	1.5	>50	1.5
Schockflüssigkeit	0.1	2	-	-
ganze Zellen	1.5	0.2	-	-

Bei der Untersuchung der isolierten inneren und äußeren Membranen im Gel zeigte sich die dem rb-Protein entsprechende Bande im Proteinmuster der äußeren Membran, während in demjenigen der inneren Membran an der betreffenden Stelle keine Proteinbande zu erkennen war (Abb.28).

Das Vorkommen von rb-Protein in der Zellhüllpräparation kann sowohl auf Assoziation mit Zellhüllbestandteilen als auch auf dem Einschluß von löslichem, in der Zellhülle lokalisiertem Protein in Membranvesikel beruhen. Da das rb-Protein in der äußeren, aber nicht in der unter gleichen Bedingungen gewonnenen inneren Membran auftritt, kann aber bei den vorliegenden Membranpräparationen ein Einschluß in Vesikel ausgeschlossen, und somit bei dem untersuchten E.coli-Stamm eine teilweise Assoziation des rb-Proteins mit der äußeren Membran angenommen werden.

Die Ergebnisse können also in der Weise zusammengefaßt werden, daß innerhalb der Aussagemöglichkeit, die die Methode des osmotischen Schocks gestattet, für das rb-Protein aufgrund der 10fachen Anreicherung in der Schockflüssigkeit eine überwiegende Lokalisation im periplasmatischen Raum anzunehmen ist. Da das Protein außerdem unter den bei der Plasmolyse gegebenen Bedingungen gemeinsam mit integralen Proteinen der äußeren Membran, allerdings in geringerer Menge, von den Zellen freigesetzt wird, kann geschlossen werden, daß das rb-Protein in ähnlicher Weise, wenn auch in geringerem Maße als die Membranproteine, in Wechselwirkung mit den Lipopolysaccharid-Bestandteilen der äußeren Membran treten kann. Auch die mögliche Isolierung des Proteins aus Zellhüllpräparationen und der Nachweis der dem rb-Protein entsprechenden Bande bei der Elektrophorese der Zellhüllen sowie der isolierten äußeren Membran von E.coli CR 34 (vgl.Abb.28) stehen mit dieser Deutung in Übereinstimmung.

Aufgrund des lipophilen Charakters der Membranen dürften bei der Assoziation des rb-Proteins vorwiegend hydrophobe Kräfte wirken, die auch bei der Aggregation des Proteins zum Tetrameren eine Rolle spielen (vgl.Kap.III.3.2.), sodaß zwischen Membranassoziation und Aggregationstendenz ein gewisser Zusammenhang erkennbar ist.

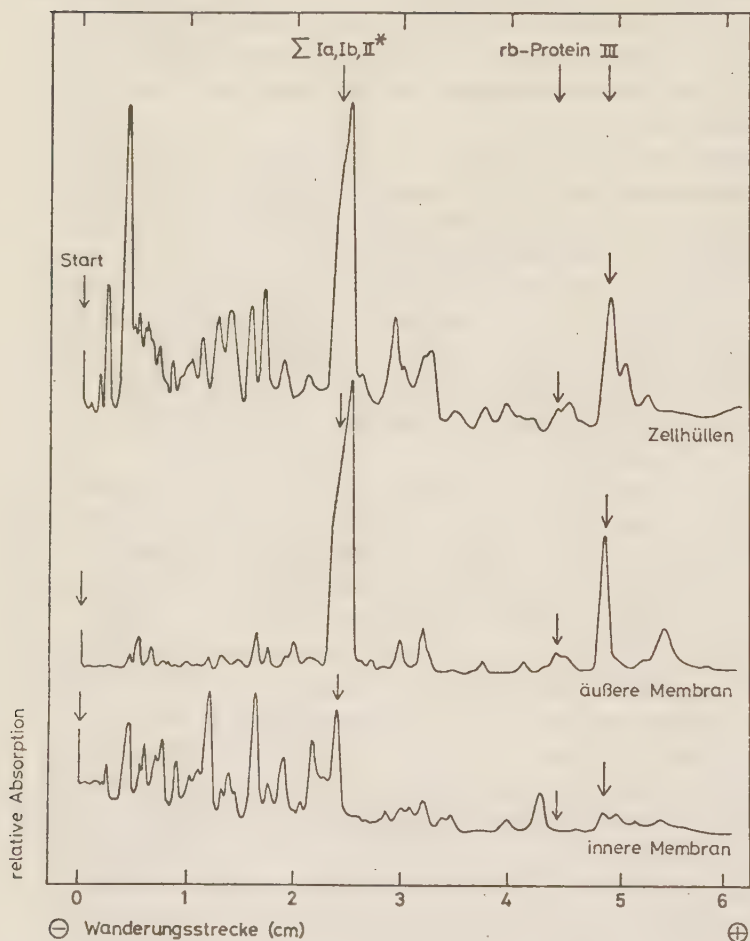


Abb.28

Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Zellhüllfraktion, äußerer und innerer Membran des Wildtyps *E.coli* CR 34 thy⁻F⁻

Isolierung der Zellhüllen und Membranen vgl. Tropschug (1977).

Von den zur Verfügung stehenden Lösungen der Fraktionen in dodecylsulfathaltigem Probenpuffer wurde jeweils das einer Proteinmenge von 15 µg entsprechende Volumen aufgetragen. Elektrophorese vgl. Methoden, Kap. 5.2.

Ia, Ib, II* und III = Hauptproteine der äußeren Membran (Hindennach and Henning, 1975) mit Molekulargewichten von 34 000 bzw. 17 000

Einschränkend ist zu bemerken, daß bei den zwei Teilschritten des Schockverfahrens aufgrund der quantitativen Auswertung des Gels insgesamt nur 35% des vorhandenen rb-Proteins, nämlich 15% bei der Plasmolyse und 20% beim Schock, abgegeben wurden (Tab.8). Dies könnte sowohl methodisch als auch in einer speziellen Eigenschaft der Wildtypzellen begründet sein. Um dies zu klären, wurden zum Vergleich Schockversuche mit der rpoB-Mutante durchgeführt. Das Verhalten dieses Stammes war auch deshalb von Interesse, weil die Isolierung des rb-Proteins, dessen Eigenschaften in den vorhergehenden Abschnitten untersucht wurde, aus dieser Mutante erfolgt war.

2. rpoB-Mutante von E.coli B

a Plasmolyse-Überstand

Die bei der Plasmolyse von Zellen der Mutante abgegebene Proteinmenge entspricht rechnerisch 0.5-1% des gesamten Zellproteins und liegt damit unter der Proteinmenge, die in diesem Stadium von Wildtypzellen abgegeben wird (Tab.7) In Übereinstimmung mit den Ergebnissen beim Wildtyp liegt das rb-Protein im Vergleich mit einer Lösung des Proteins ganzer Zellen im Plasmolyse-Überstand 7fach angereichert vor. Die Anteile des im Plasmolyse-Überstand befindlichen Proteins an den Hauptproteinen der äußeren Membran Ia, Ib, II* und III (Hindennach und Henning, 1975) zeigten ebenfalls Übereinstimmung mit den beim Wildtyp erhaltenen Werten.

Mit diesen Ergebnissen ist auch bei der Mutante eine Assoziation des rb-Proteins mit Bestandteilen der äußeren Membran wahrscheinlich.

b Schockflüssigkeit

Bei verschiedenen Schockversuchen mit der Mutante zeigten sich im prozentualen Anteil der β -Galaktosidase-Aktivität in der Schockflüssigkeit, bezogen auf die Enzymaktivität im Ultraschallaufschluß der ganzen Zellen, Schwankungen um mehr als den Faktor 10.

Während eine Variation des pH-Wertes der zur Schockbehandlung verwandten Pufferlösungen (pH 8 statt pH 7.1) keinen wesentlichen Einfluß auf das Ergebnis zeigte, erwies sich die Dauer des Plasmolysevorganges als besonders kritisch. Je länger diese gewählt

Tab.8

Berechnung der in Schockflüssigkeit und Plasmolyse-Überstand enthaltenen Mengen an rb-Protein

Anteile des rb-Proteins am Gesamtzellprotein und am in Schockflüssigkeit bzw. Plasmolyse-Überstand abgegebenem Protein vgl. Abb.27. Die Anteile des in Schockflüssigkeit bzw. Plasmolyse-Überstand abgegebenen rb-Proteins am Gesamtzellprotein wurden mit Hilfe der Prozentsätze an insgesamt in Schockflüssigkeit bzw. Plasmolyse-Überstand abgegebenem Protein (vgl.Tab.7; Mutante vgl. Spalte (2)) berechnet und daraus unter Berücksichtigung eines Anteils von 0.2% rb-Protein am Gesamtzellprotein die Prozentzahlen der letzten Spalte berechnet.

Beispiel einer Berechnung

Prozentualer Anteil des von der rpoB-Mutante in die Schockflüssigkeit abgegebenen rb-Proteins an der in ganzen Zellen enthaltenen rb-Protein-Menge:

Die Mutante gibt 6.7% des Gesamtzellproteins in die Schockflüssigkeit ab (vgl.Tab.7, Spalte (2)). Der Anteil des rb-Proteins am abgegebenen Protein beträgt 2% (Abb.27). Damit ist der Anteil des abgegebenen rb-Proteins am Gesamtzellprotein 0.13% (2% von 6.7% = 0.134%). Da das gesamte Zellprotein 0.2% rb-Protein enthält (Abb.27), wurden also mit der abgegebenen Menge von 0.13% nur 65% des in der Zelle vorhandenen rb-Proteins in die Schockflüssigkeit freigesetzt.

Anteil des rb-Proteins			Anteil des abgegebenen rb-Proteins			
am Gesamtzellprotein (%)	am abgegebenen Protein (%)		am Gesamtzellprotein (%)		an der rb-Protein-Menge in ganzen Zellen (%)	
	Schock	Plas-molyse	Schock	Plas-molyse	Schock	Plas-molyse
<u>Wildtyp</u>						
0.2	2	1.5	0.04	0.03	20	15
					$\Sigma = 35$	
<u>rpoB-Mutante</u>						
0.2	2	1.5	0.13	0.02	65	10
					$\Sigma = 75$	

wurde, umso mehr konnte Zellyse beim nachfolgenden Schock beobachtet werden (Tab.9). Außerdem mußten die plasmolysierten Zellen der Mutante im Vergleich mit denjenigen des Wildtyps äußerst vorsichtig zentrifugiert und resuspendiert werden, da eine stärkere mechanische Belastung ebenfalls vermehrte Lyse der Zellen zur Folge hatte. Dies führte zu schlechter Reproduzierbarkeit von Versuchsbedingungen und Ergebnissen.

Wurde die gleiche Plasmolyse-Dauer wie beim Wildtyp gewählt, so lag in der Regel der Prozentsatz an β -Galaktosidase-Aktivität in der Schockflüssigkeit bei 10%, wobei etwa 11% des gesamten zellulären Proteins abgegeben wurden. Der niedrigste Prozentsatz, der durch äußerst vorsichtige Behandlung der Zellen erzielt werden konnte, betrug 2.6% β -Galaktosidase-Aktivität, wobei die freige-

Tab.9

Ergebnisse des osmotischen Schocks für die rpoB-Mutante bei Variation des pH-Werts und der Dauer des Plasmolyse-Vorganges

Durchführung der Versuche und Berechnung der Ergebnisse vgl. Legende zu Tab.7. Als Bezug für die β -Galaktosidase-Aktivität in der Schockflüssigkeit wurde die in ganzen Zellen vorhandene Aktivität (= 100%) benutzt (vgl.Methoden, Kap.13.2.). Die Dauer des Plasmolyse-Vorganges umfaßt die Zeit von der Sucrosezugabe zur Zellsuspension bis zum Dekantieren des Plasmolyse-Überstandes nach der Zentrifugation (vgl.Methoden, Kap.13.1.).

Versuch	pH-Wert	Dauer des Plasmolyse-Vorgangs (min)	Schockflüssigkeit	
			β -Galaktosidase-Aktivität (%)	Anteil des abgegebenen Proteins am Gesamtzellprotein (%)
1	7.1	20	12	-
2	8.0	20	14	-
3	7.1	40	35	30 - 40
4	"	30	15	20
5	"	20	8	10
6	"	20	10	11
7	"	20	2.6	6.7

gesetzte Proteinmenge bei 6.7% des Gesamtzellproteins lag. Dieser Wert liegt wesentlich höher als beim Wildtyp (= 2.2%), während der Prozentsatz an β -Galaktosidase-Aktivität in der Schockflüssigkeit vergleichbar ist (Tab.7). Der Anteil des rb-Proteins an der in dieser Schockflüssigkeit vorhandenen Proteinmenge beträgt wie beim Wildtyp 2%. Das gesamte zelluläre Protein enthält ebenfalls 0.2% rb-Protein, sodaß auch bei der Mutante eine 10fache Anreicherung des rb-Proteins in der Schockflüssigkeit vorliegt.

Bei den beiden Teilschritten des Schockverfahrens werden nach der planimetrischen Auswertung des Dodecylsulfat-Polyacrylamidgels von der Mutante insgesamt 75% des vorhandenen rb-Proteins, nämlich 10% bei der Plasmolyse und 65% beim Schock abgegeben (Tab.8).

Es wurde überprüft, ob sich durch Affinitätschromatographie an Rifampicin-Sepharose ein mit dem hier berechneten Wert von 65% vergleichbarer Prozentsatz an dem in ganzen Zellen enthaltenen rb-Protein aus der erhaltenen Schockflüssigkeit isolieren läßt. In dem nach der Affinitätschromatographie der Schockflüssigkeit erhaltenen Harnstoffeluat der Rifampicin-Sepharose konnten 54% der Menge an rb-Protein nachgewiesen werden, die nach Auftragen des zellfreien Extraktes einer entsprechenden Menge an ganzen Zellen gewonnen werden konnte (Tab.10). Dieser Wert liegt nahe dem planimetrisch ermittelten Wert von 65% und bestätigt gleichzeitig, daß die aufgrund der elektrophoretischen Beweglichkeit dem rb-Protein zuzuordnende Bande im Proteinmuster von ganzen Zellen und Schockflüssigkeit sowie Plasmolyse-Überstand dem Protein mit der spezifischen Bindungsaffinität für Rifampicin-Sepharose entspricht.

Berücksichtigt man neben dem durch Schock abgegebenen Anteil des rb-Proteins von 65% den Anteil an membranassoziiertem Protein von 10% (Tab.8), so sind 25% des vorhandenen rb-Proteins nicht erfaßt. Aufgrund der in der Schockflüssigkeit befindlichen Proteinmenge (rechnerisch = 6.7% des Gesamtproteins einer Zelle) sollte bei der Mutante im Gegensatz zum Wildtyp weitgehende Freisetzung des löslichen periplasmatischen Proteins beim Schock anzunehmen und der nicht erfaßte Anteil des rb-Proteins weitgehend auf die bei Proteinbestimmung und planimetrischer Auswertung auftretenden

Ungenauigkeiten zurückzuführen sein. Hinzu kommt, daß die Zellen für den osmotischen Schock in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden, in der volle ribosomale Proteinsyntheseaktivität vorliegt, sodaß sich notwendigerweise ein gewisser Anteil des in den ganzen Zellen enthaltenen rb-Proteins im cytoplasmatischen Raum befinden muß und nicht durch Plasmolyse oder osmotischen Schock freigesetzt werden kann.

3. Vergleich zwischen Wildtyp und rpoB-Mutante

Ein Vergleich zwischen dem Wildtyp und der rpoB-Mutante zeigt, daß die Wildtypzellen empfindlicher gegenüber der Plasmolyse sind, wie aus den hierbei jeweils abgegebenen Proteinmengen ersichtlich ist (Tab.7), jedoch eine wesentlich höhere Stabilität beim osmotischen Schock zeigen. Dies geht sowohl aus der geringeren Menge an in die Schockflüssigkeit freigesetzter β -Galaktosidase als Maß für cytoplasmatisches Protein als auch aus der ins-

Tab.10

Isolierung von rb-Protein aus Schockflüssigkeit der rpoB-Mutante durch Affinitätschromatographie an Rifampicin-Sepharose

Schockflüssigkeit 7 (Tab.9; V = 20ml) aus 250mg Bakterien wurde vor dem Auftragen auf die Rifampicin-Sepharose-Säule (V = 2.6ml) gegen Puffer A dialysiert. Der Überstand des Ultraschallaufschlusses von 250mg Zellen desselben Kulturansatzes (V = 7ml; Herstellung vgl.Methoden, Kap.3.4.) wurde vor dem Auftragen auf eine Säule des gleichen Volumens mit Puffer A auf das Volumen der Schockflüssigkeit aufgefüllt. Beide Säulen wurden nach dem Auftragen der jeweiligen Lösung mit je 10 Säulenvolumina Puffer A und Puffer B nachgewaschen und mit 2 Säulenvolumina Puffer B mit 6M Harnstoff eluiert.

In Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelen (vgl.Methoden, Kap.5.1.) beider Eluate, auf die gleiche Volumina aufgetragen worden waren, wurde planimetrisch die der rb-Protein-Bande entsprechende Fläche bestimmt. Die nach Ultraschallaufschluß, Zentrifugation und Affinitätschromatographie aus ganzen Zellen isolierte Menge an rb-Protein bzw. die Fläche der entsprechenden Bande wurde zu 100% angenommen und die aus der Schockflüssigkeit isolierte Menge darauf bezogen.

	Ausbeute an rb-Protein (%)
Schockflüssigkeit	54
ganze Zellen (Ultraschallaufschluß)	100

gesamt beim Schock abgegebenen Proteinmenge (2.2% gegenüber 6.7% bei der Mutante) hervor. Aus der Tatsache, daß in den Schockflüssigkeiten beider Stämme das rb-Protein 10fach gegenüber einer Lösung ganzer Zellen angereichert ist, folgt, daß Unterschiede zwischen den beiden Stämmen sich auf die Gesamtmenge an abgegebenem periplasmatischem Protein und nicht selektiv auf die Abgabe von rb-Protein auswirken.

Man kennt auxotrophe Mutanten von E.coli, die nach Anzucht auf trans-Fettsäuren lediglich 20-30% der Menge an Proteinen beim osmotischen Schock freigeben, die sie nach Anzucht auf cis-Fettsäuren abgeben. Es wird vermutet, daß beim Einbau der trans-Fettsäuren eine morphologische Änderung in den Membranen eintritt, die die Abgabe von periplasmatischem Protein erschwert (Rosen and Lackette, 1972). Es bestünde die Möglichkeit, daß, z.B. aufgrund eines erhöhten Anteils an cis-Fettsäuren in den Membranen der rpoB-Mutante, ähnliche Gründe für das unterschiedliche Verhalten der beiden Stämme verantwortlich sind.

Neben der Beobachtung, daß unterschiedliche Mengen an periplasmatischem Protein beim Schock freigegeben werden, besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante im unterschiedlichen Ausmaß an dabei zu beobachtender Zellyse. Bei im Rahmen der Möglichkeiten gleicher Behandlung waren durchschnittlich 2% β -Galaktosidase-Aktivität in den Schockflüssigkeiten des Wildtyps und 10% in denen der Mutante festzustellen (Tab.7). Ebenfalls auffällig war, daß sich die Zellen der Mutante nach einer Zentrifugation erheblich leichter resuspendieren ließen als die Zellen des Wildtyps. Bei Anzucht der Bakteriophagen T_4 und T_7 (D 111) stellte sich heraus, daß diese wohl den Wildtyp E.coli B, jedoch nicht die vorliegende rpoB-Mutante zu lysieren vermögen (S.Klüpfel und G.Hartmann, 1978, unveröffentlicht). Alle diese Beobachtungen weisen auf eine veränderte Zellhülle der Mutante hin, was unter Umständen auch auf die Fettsäurezusammensetzung der Membranen (Rosen and Lackette, 1972) zurückzuführen sein könnte.

Es ist bekannt, daß Zellen mit einer Mutation im Strukturgen der β -Untereinheit der RNA-Polymerase (rpoB-Mutation nach Hayward and Scaife, 1976) zur Selektion temperatursensitiver Mutanten

dienen können (Oeschger and Berlyn, 1975), und die Mutation z.B. die Sporulation (Sonenshein and Losick, 1970) als auch die Flagellenbildung (Yamamori et al., 1977) und die Fähigkeit der Zellen, das Phagenwachstum zu unterstützen (Georgopoulos, 1971), beeinflussen kann. Parallel zum letztgenannten Punkt zeigte sich bei der vorliegenden rpoB-Mutante ebenfalls eine Auswirkung auf das Phagenwachstum. Arbeiten, in denen das Verhalten von rpoB-Mutanten beim osmotischen Schock untersucht wurde, sind bisher nicht bekannt. Jedoch erscheint es aufgrund der vorliegenden Ergebnisse durchaus möglich, daß die offensichtlich pleiotrope rpoB-Mutation auch Auswirkungen auf die Zusammensetzung und die Stabilität des Membransystems hat. Nicht vollständig ausgeschlossen werden kann auch, daß die außer der Rifampicinresistenz bestehenden Unterschiede in den Eigenschaften der Mutante gegenüber denen des Wildtyps auf eine zusätzlich erworbene, spontane Mutation an anderer Stelle des Chromosoms zurückzuführen sind, die sich direkt auf die Eigenschaften der Zellhülle auswirken.

VII. Einfluß des osmotischen Schocks auf die Rifampicin-Aufnahme von E.coli B.

Die Untersuchungen zur Lokalisation des rb-Proteins in E.coli-Zellen zeigten, daß das Protein überwiegend im periplasmatischen Raum zu finden ist. Dort treten neben hydrolysierenden Enzymen insbesondere auch sogenannte bindende Proteine auf, die aufgrund einer spezifischen Bindungsaffinität z.B. beim Eindringen von verschiedenen Zuckern oder Aminosäuren in die Zelle eine wichtige Funktion besitzen. Durch Abgabe der bindenden Proteine beim osmotischen Schock wird die Aufnahme der betreffenden Substrate teilweise oder vollständig unterbunden (Heppel, 1969; Boos, 1974).

Sollte das rb-Protein als periplasmatisches, spezifisch Rifampicin bindendes Protein bei der Aufnahme von Rifamycinen in die Zelle beteiligt sein, so müßte in entsprechender Weise nach der Freisetzung von rb-Protein durch den osmotischen Schock die Rifampicin-Aufnahme der Zellen reduziert sein.

Für einen solchen Versuch schien zunächst die rpoB-Mutante geeigneter zu sein, da durch den osmotischen Schock weitgehende Abgabe des rb-Proteins (75%; vgl.Tab.8) aus dem periplasmatischen Raum erreicht werden kann.

Suspensionen ganzer und schockbehandelter Zellen in neutraler Salzlösung wurden in Gegenwart von [^3H]Rifampicin (9 $\mu\text{g/ml}$) 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation wurde dadurch beendet, daß die Zellen bei hoher Geschwindigkeit (8 000g, 1min) sedimentiert wurden. Die Menge des von den Zellen gebundenen Antibiotikums ergab sich durch Differenzbildung zwischen der ursprünglich in der gesamten Zellsuspension enthaltenen und der im Überstand verbliebenen Radioaktivität.

Es zeigte sich, daß schockbehandelte Zellen nicht weniger, sondern etwa 3mal mehr Rifampicin binden als mit neutraler Salzlösung (M9-Salze) gewaschene, ganze Kontrollzellen (Tab.11). Eine mögliche Erklärung für dieses Resultat bot die Beobachtung, daß bei der dem osmotischen Schock vorausgehenden Plasmolyse der Zellen durch die Einwirkung von Tris-EDTA-Puffer eine unspezifische Permeabilitätsänderung der Membran bewirkt wird (Leive, 1968) und dadurch u.a. auch das Eindringen von Rifampicin in die Zelle erleichtert werden kann (Reid and Speyer, 1970). Aus diesem Grund wurde der Versuch unter Verwendung Tris-EDTA-behandelter Kontrollzellen wiederholt, die nach den Ergebnissen in Kap.VI. nur einen unwesentlichen Teil des rb-Proteins bei solcher Behandlung abgeben dürften. Im Vergleich mit diesen zeigten schockbehandelte Zellen jedoch ebenfalls eine höhere, ca. 2fache Aufnahme von Rifampicin (Tab.11).

Da vorausgegangene Untersuchungen ergeben hatten, daß die rpoB-Mutante ein extrem schockempfindliches Verhalten zeigt, wurde in gleicher Weise der Einfluß des osmotischen Schocks auf die Rifampicin-Aufnahme der weniger empfindlichen Wildtypzellen untersucht. Hierbei ergab sich, daß schockbehandelte Wildtypzellen 1.5mal mehr Rifampicin als mit neutraler Salzlösung gewaschene, ganze Kontrollzellen und die gleiche Menge Rifampicin wie mit Tris-EDTA-Puffer behandelte Kontrollzellen binden (Tab.11).

Weder beim Wildtyp noch bei der Mutante kann also eine nach der Schockbehandlung reduzierte Aufnahme von Rifampicin gemessen werden. Jedoch kann daraus nicht geschlossen werden, daß demnach das rb-Protein nichts mit der Aufnahme von Rifampicin zu tun hat, da aus den Ergebnissen mit Tris-EDTA-behandelten Kontrollzellen deutlich wird, daß vor dem osmotischen Schock, bei der Plasmolyse der Zellen in Gegenwart von Tris-EDTA, eine Vielzahl zusätzlicher Bindungsstellen, vermutlich lipophiler Natur, für das Antibiotikum zugänglich werden, und so ein möglicher Einfluß des osmotischen Schocks nicht mehr gemessen werden kann. Dies ist wohl u.a. auf den durch EDTA bewirkten Zusammenbruch der Permeationsbarriere der äußeren Membran (Leive, 1968) bei der Plasmolyse und nachfolgende Diffusion von Rifampicin durch die cytoplasmatische Membran (Nikaido, 1976) ins Zellinnere zurückzuführen.

Tab. 11

[³H]Rifampicin-Aufnahme von Wildtyp und rpoB-Mutante nach unterschiedlicher Vorbehandlung

Die Vorbehandlung der Zellen mit Salzlösung (M9-Salze) und Tris-EDTA-Puffer sowie der osmotische Schock erfolgten nach den Angaben in Methoden, Kap. 14.
Je 100 µl der verschiedenen Zellsuspensionen ($\approx 10^{10}$ Zellen) wurden nach Zugabe von 10 µl [³H] Rifampicinlösung (99 µg/ml = 1 045 IpM/µl) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die von den Zellen gebundene Radioaktivitätsmenge wurde aus der Differenz zwischen der ursprünglich in der Zellsuspension vorhandenen und der nach dem Abzentrifugieren der Zellen im Überstand verbliebenen Radioaktivitätsmenge bestimmt (vgl. Methoden, Kap. 14.)
Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-3 Messungen.

	gebundene [³ H]Rifampicinmenge (IpM/10 ⁹ Zellen) nach Behandlung durch		
	M9-Salzlösung	Tris-EDTA-Puffer	osmotischen Schock
rpoB-Mutante	168 ± 30	245 ± 35	460 ± 100
Wildtyp	255 ± 20	374 ± 30	357 ± 90
Differenz (Wildtyp - Mutante)	87	129	-123

Die Methode des osmotischen Schocks bietet also keinen geeigneten Zugang zum Studium der Aufnahme von Rifampicin in die Zelle, weil die für das Eindringen wesentliche Permeationsbarriere der äußeren Membran zerstört wird. Systeme hingegen, die bei der Aufnahme kleiner hydrophiler, aktiv in die Zelle transportierter Moleküle beteiligt sind, können damit gut erfaßt werden, da EDTA die äußere Membran und damit lediglich die für die passive Permeation dieser Moleküle wesentliche Barriere beeinflusst (Leive, 1968).

Beim Vergleich der Ergebnisse für Wildtyp und rpoB-Mutante fällt auf, daß sowohl unbehandelte als auch mit Tris-EDTA-Puffer behandelte Wildtypzellen jeweils deutlich mehr Rifampicin binden als die Zellen der Mutante. Mit Hilfe der spezifischen Radioaktivität des Rifampicins ($8\,630\text{ IpM/nmol}$; vgl. Methoden, Kap. 11.) kann berechnet werden, daß die Differenz zur Mutante in diesen Fällen 6 000 bzw. 9 000 vom Wildtyp zusätzlich gebundenen Rifampicin-Molekülen entspricht. Da die Wildtypzellen im Gegensatz zur Mutante eine sensitive, rifampicinbindende RNA-Polymerase besitzen, die Rifampicin im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 bindet (Wehrli et al., 1968), und nach einer Berechnung von Ishihama et al. (1976) E. coli B/r 8 610 Moleküle des Enzyms pro Zelle unter den für die hier verwandten Zellen gegebenen Wachstumsbedingungen (vgl. Methoden, Kap. 2.2.) enthält, kann der Unterschied zwischen den beiden Stämmen der durch RNA-Polymerase gebundenen Rifampicinmenge zugeordnet werden. Dies gilt jedoch nur unter der Annahme, daß die vermehrte Rifampicin-Aufnahme nur auf diese spezifische Bindung zurückzuführen ist und bedeutet, daß bei den beschriebenen Versuchen auch intrazelluläre Aufnahme und nicht nur oberflächliche Adsorption an lipophile Rezeptoren gemessen wurde. White and Lancini (1971) beobachteten bei Bindungsstudien ebenfalls, daß Wildtypzellen mit rifampicinsensitiver RNA-Polymerase gegenüber Zellen mit rifampicinresistentem Enzym eine der vorhandenen Menge an RNA-Polymerase entsprechende Mehraufnahme von Rifampicin zeigen.

Daß die Zellen der Mutante dagegen nach der Schockbehandlung eine wesentlich höhere Rifampicin-Aufnahme als die Wildtypzellen zeigen, kann nur dadurch erklärt werden, daß infolge der höheren Empfindlichkeit der Mutante gegenüber dem osmotischen Schock eine größere Anzahl von lipophilen Bindungsstellen im Bereich der Zellhülle bei dieser Behandlung zugänglich werden als beim Wildtyp.

VIII. Anteil des rb-Proteins am Gesamtprotein ganzer Zellen in Abhängigkeit vom Wachstumsstadium der Zellen

Das Ausmaß, in dem bestimmte Proteine von der Zelle synthetisiert werden, ist häufig von dem momentanen Bedarf an diesem Protein und damit vom Wachstumsstadium der Zelle abhängig.

Um diesen Aspekt im Hinblick auf das rb-Protein zu untersuchen, wurde der Gehalt an rb-Protein in exponentiellen und stationären Zellen des Wildtyps und der rpoB-Mutante durch quantitative Auswertung von Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelen ganzer Zellen bestimmt.

Es konnte in stationären Zellen ein Anteil des rb-Proteins von 1.4% am Gesamtzellprotein berechnet werden, während exponentielle Zellen rb-Protein in einem relativen Anteil von 0.2% am Gesamtzellprotein enthalten (Abb.29). Stationäre Zellen enthalten also 7mal soviel rb-Protein wie exponentielle Zellen. Dagegen treten die $\beta\beta'$ -Untereinheiten der RNA-Polymerase, eines Enzyms, an dem in der exponentiellen Wachstumsphase naturgemäß ein hoher Bedarf besteht, in exponentiellen Zellen in 9mal größerem Anteil als in stationären Zellen auf (Abb.29).

Dieses Ergebnis bietet einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen zur möglichen Bedeutung des rb-Proteins für die Zelle, da aus der Anreicherung in der stationären Wachstumsphase der Zellen auf eine gesteigerte Syntheserate und einen höheren Bedarf an rb-Protein während dieses Stadiums geschlossen werden kann.

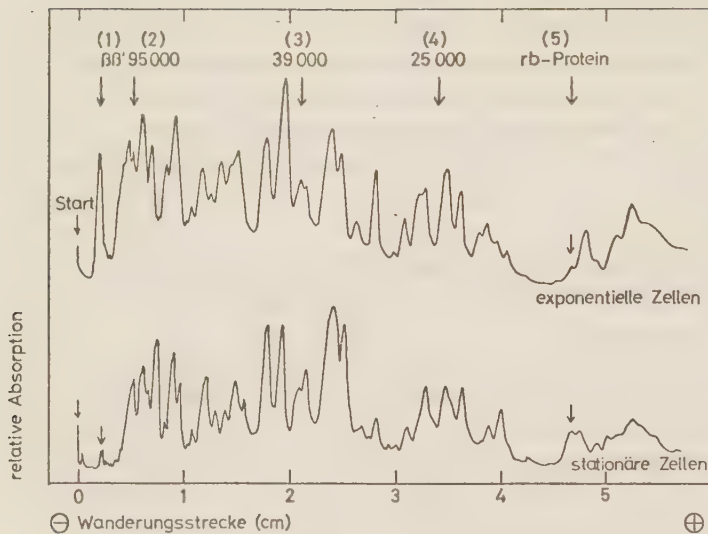


Abb.29

Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Zellen der *rpoB*-Mutante im exponentiellen und stationären Wachstumsstadium

Die Anzucht der Zellen erfolgte nach den Angaben in Methoden, Kap.2.2. und 2.3. Es wurden je 10 μ l einer Lösung der Zellen in dodecylsulfathaltigem Probenpuffer aufgetragen. Elektrophorese vgl. Methoden, Kap.5.2.

Die relativen Anteile an rb-Protein und der $\beta\beta'$ -Untereinheiten der RNA-Polymerase wurden durch planimetrische Auswertung bestimmt.

Für den Wildtyp *E.coli* B wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten.

Eichproteine vgl. Abb.12.

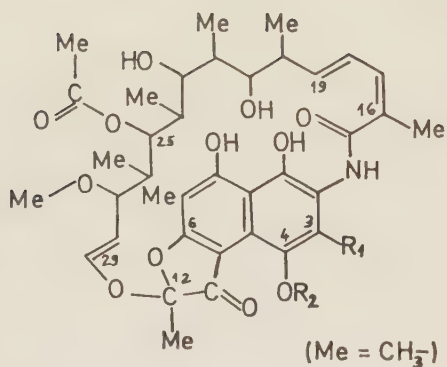
IX. Überprüfung einer möglichen Identität des rb-Proteins mit Protease I aus E.coli

Der Nachweis einer spezifischen Affinität des rb-Proteins für Rifampicin und Rifamycin SV sowie die Lokalisation in der Zellhülle können als mögliche Hinweise auf eine Beteiligung des rb-Proteins bei der Aufnahme von Rifamycinen in die E.coli-Zelle aufgefaßt werden. Es ist jedoch nicht anzunehmen, daß die Zelle ein System speziell für die Aufnahme von Rifamycinen ausbildet. Für einige Antibiotika konnte gezeigt werden, daß sie auf dem Weg strukturanaloger Nährstoffe in die Zelle eindringen (Braun,1977). Sollte dem rb-Protein eine Rolle bei der Aufnahme von Rifamycinen in die Zelle zukommen, so sollte ebenfalls vermutet werden, daß die eigentliche Funktion des Proteins eine andere ist.

Um hierauf einen Hinweis zu erhalten, wurde zunächst die Literatur daraufhin untersucht, welche im Periplasma vorkommenden Proteine eine Größe und Eigenschaften besitzen, die denen des im Rahmen dieser Arbeit isolierten Proteins ähnlich sind. In diesem Zusammenhang ist eine Arbeit von Pacaud et al.(1976) von Interesse, die von einer im Periplasma vorkommenden Protease I mit einem Molekulargewicht von 21 000 und einer gewissen Tendenz zur Dimerisierung berichtet. Diese Protease vermag N-Acetyl-DL-Phenylalanin-2-Naphtylester (Abb.30), ein synthetisches Substrat, zu hydrolysieren. Eine gewisse Strukturähnlichkeit zwischen Rifamycinen und diesem Substrat (vgl.Abb.30) führte zu der Frage, ob, im Sinne des Mißbrauchs eines für die Zelle wesentlichen Systems, das rb-Protein die enzymatische Aktivität dieser Protease besitzt und mit ihr identisch ist. Um dies zu untersuchen, wurde sowohl mit harnstofflösung desorbiertes, renaturiertes als auch spezifisch mit Rifampicin eluiertes rb-Protein im Standardaktivitätstest für die Protease eingesetzt.

Das Testprinzip besteht darin, daß bei der enzymatischen Spaltung des Substrates das 2-Naphtolanion entsteht, dessen Konzentration durch Extinktionsmessung bei 328nm bestimmt werden kann (Pacaud and Uriel,1971).

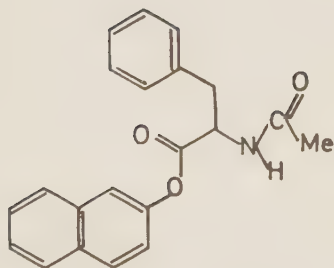
Die Kontrolle des vorliegenden Testgemisches mit Chymotrypsin (0.5µg), für welches der Ester ebenfalls Substrat ist, verlief positiv. Es wurde eine anfängliche Umsatzgeschwindigkeit von $1 \cdot 10^{-8}$ mol/min gemessen (Abb.31).



$R_1 = R_2 = H$: Rifamycin SV

$R_1 = -CH=N-N\langle \text{N-CH}_3 \rangle$; $R_2 = H$: Rifampicin

$R_1 = -CH=N-N\langle \text{N-H} \rangle$; $R_2 = H$: N-Demethylrifampicin



N-Acetyl-DL-Phenylalanin-2-Naphtylester

Die spezifische Aktivität der gereinigten Protease I beträgt 4.1 Einheiten/mg Protein (1 Einheit = $1 \mu\text{mol}$ Substratumsatz/min; Pacaud and Uriel, 1971). Unter der Voraussetzung konstanter Reaktionsgeschwindigkeit kann für $0.1 \mu\text{g}$ Protein theoretisch ein Umsatz von $4.8 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$ innerhalb von 2h berechnet werden. Mit $10\text{--}60 \mu\text{g}$, d.h. der 100–600fachen Menge des renaturierten als auch des spezifisch eluierten rb-Proteins konnte innerhalb der gleichen Zeit nur eine Extinktion erreicht werden, die einem Umsatz von $0.4 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$ entspricht (Abb.31).

Das rb-Protein besitzt also weniger als 0.1% der Aktivität der Protease I und ist damit nicht identisch mit diesem Enzym. Allerdings kann eine mögliche Inaktivierung des rb-Proteins während der Isolierung nicht ausgeschlossen werden.

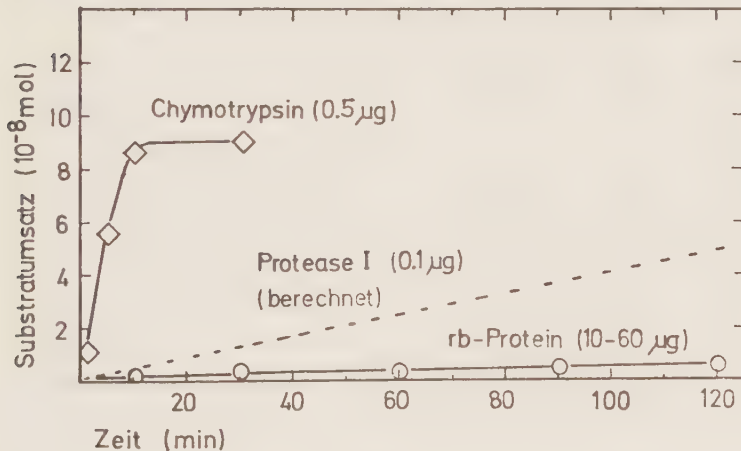


Abb.31

Prüfung des rb-Proteins auf Protease-Aktivität

Die Messungen erfolgten bei 25°C in einer Mischung von 0.05 M Na-Phosphatpuffer, pH 7.5 und Dioxan (4:1), die 0.3 mM N-Acetyl-DL-Phenylalanin-2-Naphtylester enthielt. Um die Reaktion zu starten, wurden die angegebenen Mengen an Chymotrypsin und renaturiertem oder spezifisch eluiertem rb-Protein in $10 \mu\text{l}$ Puffer B dem Testgemisch zugegeben. Der Substratumsatz wurde durch Messung bei 328 nm im Eppendorf-Photometer gegen eine Vergleichsküvette mit einer Mischung der gleichen Zusammensetzung, jedoch ohne Protein, verfolgt. Der Substratumsatz der Protease I wurde aufgrund einer spezifischen Aktivität von $4.1 \text{ Einheiten/mg Protein}$ (Pacaud et al., 1976) berechnet.

Abschließende Betrachtungen

Aufgrund seiner Affinität zu Rifampicin-Sepharose wurde ein rifampicinbindendes Protein aus Escherichia coli isoliert, das im nativen Zustand zum größten Teil als Dimer vorliegt, aus zwei gleich großen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 18 000 besteht und Tendenz zur Tetramerbildung zeigt.

Ubiquitäres Vorkommen des rb-Proteins in E.coli-Stämmen

Das rb-Protein ist vielen E.coli-Stämmen gemeinsam. Im Rahmen dieser Arbeit konnte es aus der rpoB-Mutante und aus dem Wildstamm von E.coli B 1175 isoliert werden. In Zellhüllpräparationen von E.coli CR 34 konnte das Protein durch Dodecylsulfat-Polyacrylamid-gel-Elektrophorese nachgewiesen werden (vgl. Abb. 28) und ebenfalls aus diesen durch Affinitätschromatographie an Rifampicin-Sepharose isoliert werden (Tropschug, 1977). Bei der Affinitätschromatographie von Zellextrakten aus E.coli FRE 600 trat es zusammen mit den Untereinheiten der RNA-Polymerase im Harnstoffeluat der Rifampicin-Sepharose auf (I. Skrobek, H. Lill und G. Hartmann, Würzburg 1975, unveröffentlicht). Auch konnte eine Bande mit der rb-Protein-Bande entsprechender elektrophoretischer Beweglichkeit in Zellhüllpräparationen des Wildstammes E.coli W2 und der rifampicin-resistenten Spontanmutante W7 sowie den Permeabilitätsmutanten W17 und W32 aus klinischen Isolaten (Wehrli, 1977, persönliche Mitteilung) nachgewiesen werden (Seydel, 1977, unveröffentlicht). Das ubiquitäre Vorkommen in E.coli-Stämmen läßt auf eine generelle Bedeutung des rb-Proteins für diesen Organismus schließen.

Bindungsspezifität für Rifampicin und Rifamycin SV

Die mögliche Isolierung des rb-Proteins durch Affinitätschromatographie an Rifampicin-Sepharose zeigt in Verbindung mit den in der Einleitung angeführten Argumenten, daß die Bedeutung des rb-Proteins im Zusammenhang mit der Bindung an den Liganden Rifampicin zu sehen ist. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit in besonderer Weise durch die spezifische Desorption des Proteins von Rifampicin-Sepharose mit Rifampicin bestätigt werden. In

gleicher Weise ist auch eine spezifische Desorption mit Rifamycin SV möglich. Daraus ist zu ersehen, daß nicht der hydrophobe, synthetische Rest des Rifampicin-Moleküls der für die Bindung wesentliche Teil ist, sondern daß das rb-Protein spezifische Bindungsaffinität für das natürliche Rifamycin-Gerüst besitzt und ihm aufgrund dieser weiter gefaßten Eigenschaft eine Bedeutung zukommt.

Die spezifische Bindung von Rifampicin an das rb-Protein äußert sich in einer Verschiebung der Tryptophan- und Tyrosinabsorption des Proteins zu längeren Wellenlängen, während für die nach Inkubation in Gegenwart sehr hoher Rifampicinkonzentrationen beobachtete Aggregation des Proteins zum Tetrameren weniger spezifische Effekte verantwortlich sein dürften.

Die durch Gleichgewichtsdialyse ermittelte Bindungskonstante des rb-Proteins für Rifampicin beträgt $10^{-4}M$.

Lokalisation im Periplasma und Vergleich mit periplasmatischen bindenden Proteinen

Untersuchungen zur Lokalisation des Proteins in der Zelle ergaben, daß das rb-Protein in der Schockflüssigkeit von E.coli-Zellen 10fach angereichert auftritt, aber zu einem gewissen Anteil auch schon bei der dem osmotischen Schock vorausgehenden Plasmolyse der Zellen freigesetzt wird.

Im allgemeinen ist für die Freisetzung von periplasmatischen Proteinen aus E.coli ein osmotischer Übergang von der Sucroslösung in Wasser oder verdünnte $MgCl_2$ -Lösung notwendig. Abgabe geringer Proteinmengen bei der Plasmolyse wurde jedoch ebenfalls beobachtet, wie z.B. bei den periplasmatischen Proteinen Ribonuclease I und DNA-Endonuclease, die zu 7% bzw. 15% bereits in diesem Stadium freigegeben werden (Nossal and Meppel, 1966). Ähnliches wird von einem bindenden Protein für Vitamin B 12 berichtet, das jeweils zu 50% im Plasmolyse-Medium und in der Schockflüssigkeit auftritt (Taylor et al., 1972). Von dem gramnegativen Bakterium Spirillum itersonii werden einige periplasmatische Proteine sogar selektiv während der Plasmolyse abgegeben (Garrard, 1971). Diese Beobachtungen können so zusammengefaßt werden, daß periplasmatische Proteine auf jeweils spezifische und unabhängige Art durchaus an Struktur-

komponenten der Zellhülle gebunden sein können, und das rb-Protein in diesem Sinne als periplasmatisches Protein zu bezeichnen ist. Im Periplasma treten hydrolytische sowie sogenannte bindende Proteine auf, die spezifische Bindungsaffinitäten für kleinere Moleküle wie Zucker, Aminosäuren oder Vitamine besitzen (Heppel, 1969). Nach den bisher bekannten Eigenschaften und in Anlehnung an die Definition eines bindenden Proteins, das eine reversible Bindung mit Substrat eingeht, ohne dabei eine chemische Änderung zu katalysieren (Heppel, 1969), kann das Protein der Klasse der bindenden Proteine zugeordnet werden, die in einer Häufigkeit von $2-6 \cdot 10^4$ Molekülen pro Zelle vorkommen (Boos, 1974). Für das rb-Protein können mit einem Anteil am Gesamtzellprotein von 0.2% (vgl. Abb. 27) und mit der Kenntnis des Gesamtproteingehalts der Zellen (110 µg Protein/mg Zellen Feuchtwicht (vgl. Tab. 7) $\hat{=}$ $7 \cdot 10^8$ Zellen) $1 \cdot 10^4$ Moleküle des im nativen Zustand als Dimer vorliegenden Proteins pro Zelle berechnet werden. Dies entspricht der Häufigkeit der bindenden Proteine.

Die Größe der Untereinheiten des rb-Proteins liegt mit 18 000 ebenfalls in der Größenordnung derjenigen der bekannten bindenden Proteine mit Molekulargewichten von 22 000 - 42 000 (Boos, 1974). Ungewöhnlich für diese Klasse von Proteinen, die mit Ausnahme des galaktosebindenden Proteins (Rasched et al., 1976) nur in der monomeren Form vorkommen (Boos, 1974), ist jedoch die Assoziation zum Dimeren und Tetrameren.

Betrachtungen zur möglichen Funktion des rb-Proteins bei der Aufnahme von Rifamycinen in die Zelle

Da periplasmatische bindende Proteine bei der Aufnahme ihrer Bindungssubstrate in die Zelle beteiligt sind (Boos, 1974), kann auch für das periplasmatische rifamycinbindende Protein eine solche Funktion diskutiert werden.

Für die Aufnahme von Antibiotika ins Zellinnere bestehen die gleichen Möglichkeiten wie für die Aufnahme von Substraten, nämlich aktiver Transport, erleichterte Diffusion und passive Diffusion (Zähner, 1977). Die bekannten bindenden Proteine, die ihre Substrate mit Dissoziationskonstanten von 10^{-5} - 10^{-6} M binden, sind Teil der aktiven, in der Cytoplasmamembran lokalisierten

Transportsysteme für diese meist hydrophilen Substrate (Boos,1974). Im Falle des rb-Proteins ist kaum eine solche Funktion anzunehmen, da nach neueren Untersuchungen vermutet wird, daß für hydrophobe Substanzen wie z.B. Rifamycine die cytoplasmatische Membran keine Permeationsbarriere bildet und durch Diffusion überwunden wird (Nikaido,1976). Jedoch kommt beim Studium der Aufnahme von Rifamycinen durch gramnegative Bakterien der äußeren Zellemban eine wichtige Bedeutung zu. Diese bildet für hydrophobe Moleküle unterschiedlicher Größe, wie auch für hydrophile Moleküle mit einem Molekulargewicht >600 , eine wesentliche Permeationsbarriere (Nikaido,1976; Decad and Nikaido,1976). Für hydrophile Nährstoffe und Antibiotika unterhalb der Ausschlußgrenze wird freie Diffusion durch unspezifische, aus einem der Hauptproteine aufgebaute, hydrophile Poren angenommen (Nakae,1976). Für einige hydrophile Antibiotika konnte gezeigt werden, daß sie die Cytoplasmamembran über die Wege strukturanaloger, aktiv transportierter Nährstoffe überwinden und ebenfalls aktiv ins Zellinnere transportiert werden. Beispiele sind D-Cycloserin, das über das energieabhängige Transportsystem für D-Alanin und Glycin eindringt (Wargel et al.,1970), und die Tripeptidantibiotika, die aufgrund ihrer Strukturanalogie zu Oligopeptiden aufgenommen werden (Diddens et al.,1976). Für die natürlichen Substrate dieser in der Cytoplasmamembran lokalisierten, aktiven Transportsysteme und ihre strukturanalogen Antibiotika bildet die äußere Membran mit ihren unspezifischen Poren keine Permeationsbarriere. Jedoch sind Antibiotika wie die Sideromycine bekannt, die auch die Barriere der äußeren Membran nur aufgrund ihrer Strukturanalogie mit den für die Eisenversorgung der Zelle notwendigen Sideraminen überwinden können (Zähner,1977). Auch die Erkenntnis, daß in der äußeren Membran vorkommende Phagen- und Colicinrezeptorproteine wesentlich beim Eindringen verschiedenster hydrophiler Moleküle in die Zelle beteiligt sind, zeigte, daß auch in dieser Membran mehr oder weniger spezifische Poren für bestimmte Substratgruppen vorhanden sind (Braun,1977).

Darüber, wie hydrophobe Substanzen und Antibiotika wie z.B. Rifamycine diese Permeationsbarriere überwinden, ist nur soviel bekannt, daß keine eindeutige Ausschlußgrenze bezüglich der Größe besteht, und daß sowohl die Struktur des Lipopolysaccharids als auch die Länge der Proteine, die sich in der äußeren Membran befinden, einen wesentlichen Einfluß haben. Obwohl aufgrund der begrenzten Anzahl von Proteinen in der Membran für hydrophobe Moleküle eher ein Eindringen durch Lösen in der Kohlenwasserstoffphase, also durch passive Diffusion, anzunehmen ist, ist eine durch Vermittlung von Proteinen erleichterte Diffusion nicht auszuschließen (Nikaido, 1976).

Falls dem rb-Protein eine derartige Funktion bei der Aufnahme von Rifamycinen in die Zelle zukommt, sollte, ähnlich wie es bei den Systemen der Fall ist, die bei der Aufnahme einiger zu Nährstoffen strukturanaloger Antibiotika beteiligt sind, die eigentliche Bedeutung des rb-Proteins für die Zelle in anderem Zusammenhang bestehen. Denn es ist kaum anzunehmen, daß die Zelle ein System speziell für die Aufnahme von Rifamycinen ausbildet.

Deshalb wurde das rb-Protein auf eine mögliche Identität mit anderen in der Zellhülle lokalisierten Proteinen untersucht. Da gleichzeitige spezifische Bindungseigenschaften für Rifamycine und die hydrophilen Zucker und Aminosäuren aufgrund unterschiedlicher Struktur und Größe kaum anzunehmen sind, und die diese Moleküle bindenden periplasmatischen Proteine im Gegensatz zum rb-Protein fast nur monomer auftreten und kein Fall von Membranassoziation bekannt ist (Doos, 1974), kann eine Identität mit einem dieser Proteine ausgeschlossen werden. Auch die Frage nach einer möglichen Identität mit der im Periplasma vorkommenden Protease I aus E.coli (Pacaud et al., 1976) mußte negativ beantwortet werden.

Da das rb-Protein teilweise membranassoziiert zu sein scheint, müssen bei einer vergleichenden Untersuchung auch die Proteine der äußeren Membran betrachtet werden. Dort kommen neben den Hauptproteinen (Hindennach and Henning, 1975), die aufgrund unterschiedlicher Größe bei der Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese deutlich getrennt vom rb-Protein wandern (vgl. Abb. 27), ca. 30-50 verschiedene Polypeptide in unterschiedlichen Mengen-

anteilen vor (Haller et al., 1975; Sato et al., 1977). Mit Ausnahme der verschiedenen Phagen- und Colicinrezeptoren, denen zum größten Teil Transportfunktionen zugeordnet werden konnten (Braun, 1977), die aber ausschließlich und in wesentlich größerer Menge als das rb-Protein in der Membran auftreten, ist die Bedeutung dieser Proteine noch weitgehend ungeklärt, sodaß auch auf diesem Wege keine weiteren Schlüsse auf eine anderweitige Funktion des rb-Proteins gezogen werden können.

Die Vermutung einer Funktion des rb-Proteins bei der Aufnahme von Rifamycinen in die Zelle war aufgrund von Versuchen, bei denen die Rifampicinaufnahme ganzer und schockbehandelter Zellen verglichen wurde, nicht experimentell belegbar, war jedoch auch nicht eindeutig auszuschließen.

Ein erfolgversprechender Zugang zur schlüssigen Beantwortung dieser Frage wäre das Auffinden einer geeigneten Mutante, wie zahlreiche Beispiele zeigen, bei denen veränderte Aufnahmeeigenschaften für bestimmte Substrate mit dem Ausfall oder einer Veränderung von an der Aufnahme beteiligten Proteinen in Verbindung gebracht und dadurch deren Beteiligung bei der Aufnahme dieser Substrate bewiesen werden konnte. Beispielsweise wurde eine Mutante mit einem Defekt im β -methylgalaktosid-Transportsystem isoliert, die ein strukturell verändertes galaktosebindendes Protein besitzt (Boos, 1972). Bei einer temperatursensitiven Mutante konnte das defekte Histidin-Transportsystem u.a. auf die verminderte Hitzestabilität eines histidinbindenden Proteins zurückgeführt werden (Ames and Lever, 1972). Bei anderen Mutanten wurde der vollständige Ausfall des histidinbindenden Proteins nachgewiesen (Ames, 1974). Der Ausfall von an Transportsystemen beteiligten Phagen- und Colicinrezeptorproteinen der äußeren Membran konnte bei für den Transport von Vitamin B 12 (Bradbeer et al., 1976) und Eisen (Hancock et al., 1976) defekten Mutanten gefunden werden, und Mutanten, die den λ -Rezeptor nicht besitzen, zeigen eine reduzierte Aufnahmeschwindigkeit für Maltose (Szmecman et al., 1976; Braun and Krieger-Brauer, 1977).

In entsprechender Weise dürfte die Entscheidung für oder gegen eine Funktion des rb-Proteins bei der Aufnahme von Rifamycinen wohl erst durch eine Kombination der biochemischen mit genetischen Untersuchungen möglich sein.

Auf der Suche nach rifampicinresistenten Mutanten, die u.a. ein in seinen Eigenschaften verändertes rb-Protein besitzen, wurde von M.Tropschug (1977) die rifampicinresistente Permeabilitätsmutante Rif^r41 des Stammes Escherichia coli CR 34 isoliert, die jedoch im Vergleich mit dem Wildtyp ein rb-Protein mit unverändertem Bindungsverhalten an Rifampicin-Sepharose (Tropschug, 1977) sowie unveränderte elektrophoretische Beweglichkeit im Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel (Seydel, 1977, unveröffentlicht) zeigt. Dies läßt vermuten, daß bei dieser Mutante die auf der veränderten Permeabilität der Zellhülle beruhende Resistenz gegen Rifampicin nicht mit dem rb-Protein in Verbindung steht.

Die Isolierung einer rifampicinresistenten Mutante, die neben veränderten Aufnahmeeigenschaften für das Antibiotikum das rb-Protein nicht bzw. in geringerer Menge oder ein Protein mit veränderter Bindungsaffinität oder anderen abweichenden Eigenschaften besitzt, wäre ein Schritt in dieser Richtung.

Literaturverzeichnis

- Ames, G.F.-L. (1974) "Resolution of Bacterial Proteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis on Slabs", J.Biol.Chem. 249, 634 - 644
- Ames, G.F.-L. and Lever, J.E. (1972) "The Histidine-binding Protein J Is a Component of Histidine Transport. Identification of its Structural Gene, his J*", J.Biol.Chem. 247, 4309 - 4316
- Andrews, P. (1965) "The Gel-Filtration Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weights over a Wide Range", Biochem.J. 96, 595 - 606
- Bähr, W., Stender, W., Scheit, K.-H., and Jovin, T.M. (1976) "Binding of Rifampicin to Escherichia coli RNA Polymerase: Thermodynamic and Kinetic Studies" in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M.J., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 369 - 396
- Bensadoun, A. and Weinstein, D. (1976) "Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials", Anal.Biochem. 70, 241 - 250
- Boos, W. (1972) "Structurally Defective Galactose-binding Protein Isolated from a Mutant Negative in the β -Methylgalactoside Transport System of Escherichia coli", J.Biol.Chem. 247, 5414 - 5424
- Boos, W. (1974) "Bacterial Transport", Annu.Rev.Biochem. 43, 123 - 146
- Boos, W., Gordon, A.S., Halland, R.E., and Price, H.D. (1972) "Transport Properties of the Galactose-binding Protein of E.coli. Substrate Induced Conformational Change" J.Biol.Chem. 247, 917 - 924
- Bradbeer, C., Woodrow, M.L., and Khalifah, L.J. (1976) "Transport of Vitamin B 12 in Escherichia coli: Common Receptor System for Vitamin B 12 and Bacteriophage BF23 on the Outer Membrane of the Cell Envelope", J.Bacteriol. 125, 1032 - 1039
- Braun, V. (1977) "Membranpermeation und Antibiotika-Resistenz bei Bakterien", Naturwissenschaften 64, 126 - 132
- Braun, V. and Krieger-Brauer, H.J. (1977) "Interrelationship of the Phage λ Receptor Protein and Maltose Transport in Mutants of Escherichia coli K 12", Biochim.Biophys.Acta 469, 89 - 98
- Burgess, R.R. (1969) "Separation and Characterization of the Subunits of Ribonucleic Acid Polymerase", J.Biol.Chem. 244, 6168 - 6176
- Decad, G.M. and Nikaido, H. (1976) "Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria.XII. Molecular Sieving Function of Cell Wall" J.Bacteriol. 128, 325 - 326
- Deranleau, D.A. (1969) "Theory of the Measurement of Weak Molecular Complexes. I. General Considerations" J.Am.Chem.Soc. 91, 4044 - 4049

- Determann, H. and Michel, W. (1966) "The Correlation between Molecular Weight and Elution Behaviour in the Gel Chromatography of Proteins", *J.Chromatogr.* 25, 303 - 313
- Diddens, H., Zähler, H., Kraas, E., Göhring, W., and Jung, G. (1976) "On the Transport of Tripeptide Antibiotics in Bacteria", *Eur.J.Biochem.* 66, 11 - 23
- Dunker, A.K. and Rueckert, R.R. (1969) "Observations on Molecular Weight Determinations on Polyacrylamide Gel", *J.Biol.Chem.* 244, 5074 - 5080
- Englund, P.T., Hubermann, I.A., Jovin, T.M., and Kornberg, A. (1969) "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. XXX. Binding of Triphosphates to Deoxyribonucleic Acid Polymerase", *J.Biol.Chem.* 244, 3038 - 3044
- Garrard, W.T. (1971) "Selective Release of Proteins from Spirillum itersonii by Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane and Ethylenediaminetetraacetate", *J.Bacteriol.* 105, 93 - 100
- Georgopoulos, C.P. (1971) "Bacterial Mutants in Which the Gene N Function of Bacteriophage Lambda Is Blocked Have an Altered RNA Polymerase", *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 68, 2977 - 2981
- Haller, I., Hoehn, B., and Henning, U. (1975) "Apparent High Degree of Asymmetry of Protein Arrangement in the Escherichia coli Outer Cell Envelope Membrane", *Biochemistry* 14, 478 - 484
- Hancock, R.E.W., Hantke, K., and Braun, V. (1976) "Iron Transport in Escherichia coli K-12: Involvement of the Colicin B Receptor and of a Citrate-Inducible Protein", *J.Bacteriol.* 127, 1370 - 1375
- Hantke, K. (1976) "Phage T6 - Colicin K Receptor and Nucleoside Transport in Escherichia coli", *FEBS Lett.* 70, 109 - 112
- Hayward, R.S. and Scaife, I.G. (1976) "Systematic Nomenclature for the RNA Polymerase Genes of Prokaryotes" *Nature (London)* 260, 646 - 647
- Hedrick, J.L. and Smith, A.L. (1968) "Size and Charge Isomer Separation and Estimation of Molecular Weights of Proteins by Disc Gel Electrophoresis", *Arch.Biochem.Biophys.* 126, 155 - 164
- Heil, A. and Zillig, W. (1970) "Reconstitution of Bacterial DNA-Dependent RNA-Polymerase from Isolated Subunits as a Tool for the Elucidation of the Role of the Subunits in Transcription", *FEBS Lett.* 11, 165 - 168
- Heppel, L.A. (1969) "The Effect of Osmotic Shock on Release of Bacterial Proteins and on Active Transport", *J.Gen.Physiol.* 54, 95s- 109s
- Heyningen van, S. (1972) "An Alkaline Protease from Acremonium kiliense. The Enzyme Protein and Its Properties in Solutions of Urea and Sodium Dodecylsulfate", *Eur.J.Biochem.* 27, 436 - 442

- Hindennach, I. and Henning, U. (1975) "The Major Proteins of the Escherichia coli Outer Cell Envelope Membrane. Preparative Isolation of All Major Membrane Proteins", Eur.J.Biochem. 59, 207 - 213
- Hoch, S.O'Neil, DeMoss, R.D. (1972) "Tryptophanase from Bacillus alvei. I. Subunit Structure", J.Biol.Chem. 247, 1750 - 1756
- Ishihama, A., Taketo, M., Saitoh, T., and Fukuda, R. (1976) "Control of Formation of RNA Polymerase in Escherichia coli" in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M.J., eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 485 - 502
- Jaenicke, L. (1966) "Einführung in die Praxis des Biochemikers", Institut für Biochemie der Universität Köln, als Manuskript gedruckt, S. 40-41
- Jenissen, H.P. (1977) "Multivalent Interactions on Hydrophobic Agaroses", Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 358, 255
- Kauzmann, W. (1959) "Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation" in "Advances in Protein Chemistry", Vol.XIV (Anfinsen, C.B., Anson, M.L., Bailey, K., and Edsall, J.T., eds.), Academic Press, New York and London, pp. 1 - 63
- Laemmli, K.U. (1970) "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", Nature (London) 227, 680 - 685
- Langerman, N.R. and Klotz, J.M. (1969) "Free Energy of Subunit Interactions. Hemerythrin", Biochemistry 8, 4746 - 4752
- Leive, L. (1968) "Studies on the Permeability Change Produced in Coliform Bacteria by Ethylenediaminetetraacetate", J.Biol.Chem. 243, 2373 - 2380
- Leive, L., Shovlin, V.K., and Mergenhagen, S.E. (1968) "Physical, Chemical, and Immunological Properties of Lipopolysaccharide Released from Escherichia coli by Ethylenediaminetetraacetate", J.Biol.Chem. 243, 6384 - 6391
- Lill, H.I. (1973) "Wirkung von Proteasen auf Funktion, Aufbau und Gestalt der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus Escherichia coli", Dissertation, Universität Würzburg
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", J.Biol.Chem. 193, 265 - 275
- Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., van der Hoek, P., and van Alphen, L. (1975) "Electrophoretic Resolution of the 'Major Outer Membrane Protein' of Escherichia coli K 12 into Four Bands", FEBS Lett. 58, 254 - 258
- Maggi, N., Pasqualucci, C.R., Ballotta, R., and Sensi, P. (1966) "Rifampicin: A New Orally Active Rifamycin", Chemotherapy 11, 285 - 292
- Malamy, M. and Horecker, B.L. (1961) "The Localization of Alkaline Phosphatase in E.coli K 12", Biochem.Biophys.Res.Comm. 5, 104 - 108

- Martin, R.G. and Ames, B.N. (1961) "A Method for Determining the Sedimentation Behaviour of Enzymes: Application to Protein Mixtures", *J.Biol.Chem.* 236, 1372 - 1379
- Maurer, H.R. (1971) "Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis", Verlag Walter de Gruyter, Berlin-New York
- Nakae, T. "Identification of the Outer Membrane Protein of E.coli that Produces Transmembrane Channels in Reconstituted Vesicle Membranes", *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 71, 877 - 884
- Neu, H.C. and Heppel, L.A. (1965) "The Release of Enzymes from Escherichia coli by Osmotic Shock and during the Formation of Spheroplasts", *J.Biol.Chem.* 240, 3685 - 3692
- Neudecker, T. (1970) "Stabilität und Bindungsstellen der Adenosinkinase", Diplomarbeit, Universität Würzburg
- Nikaido, H. (1976) "Outer Membrane of Salmonella typhimurium. Transmembrane Diffusion of Some Hydrophobic Substances", *Biochim.Biophys.Acta* 433, 118 - 132
- Nossal, N.G. and Heppel, L.A. (1966) "The Release of Enzymes by Osmotic Shock from Escherichia coli in Exponential Phase", *J.Biol.Chem.* 241, 3055 - 3062
- Oeschger, A.P. and Berlyn, M.K.B. (1975) "Regulation of RNA Polymerase Synthesis in Escherichia coli: A Mutant Unable to Synthesize the Enzyme at 43°C", *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 72, 911 - 915
- Osborn, E.J., Gander, J.E., Parisi, E., and J.Carson (1972) "Mechanism of Assembly of the Outer Membrane of Salmonella typhimurium. Isolation and Characterization of Cytoplasmic and Outer Membrane", *J.Biol.Chem.* 247, 3962 - 3972
- Pacaud, M. and Uriel, I. (1971) "Isolation and Some Properties of a Proteolytic Enzyme from Escherichia coli (Protease I)" *Eur.J.Biochem.* 23, 435 - 442
- Pacaud, M., Sibilli, L. and LeBras, G. (1976) "Protease I from E.coli. Some Physicochemical Properties and Substrate Specificity", *Eur.J.Biochem.* 69, 141 - 151
- Rasched, J., Shuman, H., and Boos, W. (1976) "The Dimer of the Escherichia coli Galactose-Binding Protein", *Eur.J.Biochem.* 69, 545 - 550
- Ratner, D. (1974) "The Interaction of Bacterial and Phage Proteins with Immobilized Escherichia coli RNA Polymerase", *J.Mol.Biol.* 88, 373 - 383
- Reid, P. and Speyer, J. (1970) "Rifampicin Inhibition of Ribonucleic Acid and Protein Synthesis in Normal and Ethylene-diaminetetraacetic Acid-Treated Escherichia coli", *J.Bacteriol.* 104, 376 - 389
- Richardson, C.C., Schildkraut, C.L., Aposhian, H.V., and Kornberg, A. (1964) "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. XIV. Further Purification and Properties of Deoxyribonucleic Acid Polymerase of Escherichia coli", *J.Biol.Chem.* 239, 222 - 232

- Rosen, B.P. and Hackette, S.L. (1972) "Effects of Fatty Acid Substitution on the Release of Enzymes by Osmotic Shock", J.Bacteriol. 110, 1181 - 1189
- Sato, T., Ito, K., and Yura, T. (1977) "Membrane Proteins of Escherichia coli K-12. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Inner and Outer Membrane", Eur.J.Biochem. 78, 557 - 567
- Scatchard, G. (1949) "The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions", Ann.N.Y.Acad.Sci. 51, 660 - 672
- Scheit, K.-H. and Stütz, A. (1975) "The Affinity of E.coli RNA Polymerase to Matrix Bound Rifamycin", FEBS Lett. 50, 25 - 27
- Schweizer, M. and Henning, U. (1977) "Action of a Major Outer Cell Envelope Membrane Protein in Conjugation of Escherichia coli K-12", J.Bacteriol. 129, 1651 - 1652
- Schweizer, M., Hindennach, I., Garten, W., and Henning, U. (1978) "Major Proteins of the Escherichia coli Outer Cell Envelope Membrane. Interaction of Protein II* with Lipopolysaccharide", Eur.J.Biochem. 82, 211 - 217
- Shapiro, A.L., Viñuela, E., and Maizel, I.V. (1967) "Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels", Biochem.Biophys.Res.Commun. 28, 815 - 820
- Sonenshein, A.L. and Losick, R. (1970) "RNA-Polymerase Mutants Blocked in Sporulation", Nature (London) 227, 906 - 909
- Szmecman, S., Schwartz, M., Silhavy, T.J., and Boos, W. (1976) "Maltose-Transport in Escherichia coli K 12", Eur.J.Biochem. 65, 13 - 19
- Taylor, R.T., Lorrell, S.A., and Hanna, M.L. (1972) "Uptake of Cyanocobalamin by Escherichia coli B: Some Characteristics and Evidence for a Binding Protein", Arch.Biochem.Biophys. 148, 366 - 381
- Thiede, R. und Zachau, H.G. (1965) "Zur Fraktionierung der löslichen Ribonucleinsäure", Biochim.Biophys.Acta 103, 568 - 578
- Tropschug, M. (1977) "Isolierung und Charakterisierung von Rifampicin-eindringungsresistenten Mutanten von Escherichia coli", Diplomarbeit, Universität München
- Wargel, R.J., Shadur, C.A., and Neuhaus, F.C. (1970) "Mechanism of D-Cycloserine Action: Transport Systems for D-Alanine, D-Cycloserine, L-Alanine, and Glycine", J.Bacteriol. 103, 778 - 788
- Weber, K. and Osborn, M. (1969) "The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis", J.Biol.Chem. 244, 4406 - 4412

- Weber, K., Pringle, I.R., and Osborn, M. (1972) "Measurement of Molecular Weights by Electrophoresis on SDS-Acrylamide Gels" in "Methods in Enzymology" Vol.XXVI C (Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.W., eds.), Academic Press New York and London, pp. 3 - 27
- Weber, K. and Osborn, M. (1975) "Proteins and Sodium Dodecyl Sulfate: Molecular Weight Determination on Polyacrylamide Gels and Related Procedures" in "The Proteins" Vol.I(3rd ed.) (Neurath, H. and Hill, R.L., eds.), Academic Press New York, San Francisco, London, pp. 180 - 223
- Weder, H.G., Schildknecht, J., Lutz, R.A., and Kesselring, P. (1974) "Determination of Binding Parameters from Scatchard Plots. Theoretical and Practical Considerations", Eur.J.Biochem. 42, 475 - 481
- Wehrli, W. (1977) "Kinetic Studies of the Interaction between Rifampicin and DNA-Dependent RNA-Polymerase of Escherichia coli", Eur.J.Biochem. 80, 325 - 330
- Wehrli, W., Knüsel, F., Schmid, K., and Staehelin, M. (1968) "Interaction of Rifampicin with Bacterial RNA Polymerase", Proc.Natl.Acad.Sci.USA 61, 667 - 673
- Wehrli, W. and Staehelin, M. (1969) "The Rifamycins - Relation of Chemical Structure and Action on RNA Polymerase", Biochim.Biophys.Acta 182, 24 - 29
- Wehrli, W. and Staehelin, M. (1971) "Actions of the Rifamycins", Bacteriol.Rev. 35, 290 - 309
- Wehrli, W., Handschin, I., and Wunderli, W. (1976) "Interaction between Rifampicin and DNA-Dependent RNA Polymerase of Escherichia coli" in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M.J., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 397 - 412
- White, R.J. and Lancini, G. (1971) "Uptake and Binding of [³H]Rifampicin by Escherichia coli and Staphylococcus aureus", Biochim.Biophys.Acta 240, 429 - 434
- Wyss, E. and Wehrli, W. (1976) "The Use of Dextran-Coated Charcoal for Kinetic Measurements: Interaction between Rifampicin and DNA-Dependent RNA-Polymerase of Escherichia coli", Anal.Biochem. 70, 547 - 553
- Yamamori, T., Ito, K., Yura, T., Suzuki, T., and Ino, T. (1977) "Ribonucleic Acid Polymerase Mutant of Escherichia coli Defective in Flagella Formation", J.Bacteriol. 132, 254 - 261
- Zähner, H. (1977) "Einige Aspekte der Antibiotica-Forschung", Angew.Chem. 89, 696 - 703

Zusammenfassung

1. Aufgrund seiner Affinität zu Rifampicin-Sepharose wurde ein rifampicinbindendes Protein (rb-Protein) aus E.coli B gewonnen. Nach dem Auftragen eines zellfreien Extraktes auf Rifampicin-Sepharose wurde durch Elution mit Harnstofflösung ein Proteingemisch erhalten, aus dem durch Cellogel-Elektrophorese renaturiertes rb-Protein in reiner Form isoliert werden konnte. Das rb-Protein konnte im Gegensatz zu den Begleitproteinen zu 75% erneut an Rifampicin-Sepharose gebunden, und damit die Bindungsaffinität für den Liganden Rifampicin nachgewiesen werden. rb-Protein konnte jedoch auch spezifisch sowohl durch Rifampicin als auch durch Rifamycin SV von Rifampicin-Sepharose desorbiert und auf diese Weise in einem Anreicherungsschritt in 95%iger Reinheit aus einem rohen, zellfreien Extrakt gewonnen werden. Dies zeigt, daß das rb-Protein spezifische Bindungsaffinität für das natürliche Rifamycin-Gerüst besitzt.
2. Das rb-Protein besitzt im nativen Zustand ein Molekulargewicht von $36\,500 \pm 3\,000$ und besteht aus 2 gleich großen Untereinheiten. In Lösungen mit höherer Proteinkonzentration ist Tetramerbildung mit einer Gleichgewichtskonstanten von 10^4 M^{-1} möglich. Die Abhängigkeit des Tetrameranteils von der Salzkonzentration der Lösung sowie der bei Assoziation freiwerdende Energiebetrag von rund 5 kcal/mol weisen auf Beteiligung hydrophober Wechselwirkungen hin.
3. Die spezifische Bindung von Rifampicin an rb-Protein äußert sich in einer teilweisen Verschiebung der Proteinabsorption bei 280nm zu höheren Wellenlängen. Die Dissoziationskonstante für diese Bindung beträgt nach Untersuchungen durch Gleichgewichtsdialyse $1.7 \cdot 10^{-4} \pm 0.3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Hierbei werden vom spezifisch eluierten Protein 2 Moleküle Rifampicin pro Dimer gebunden, sodaß für dieses Protein im Gegensatz zum renaturierten Protein, das nur 1 Molekül Rifampicin pro Dimer bindet, die Existenz zweier in ihrem Bindungsverhalten identischer Untereinheiten anzunehmen ist.

4. Durch Anwendung des osmotischen Schocks konnte gezeigt werden, daß das rb-Protein im periplasmatischen Raum der E.coli-Zelle lokalisiert und in gewissem Maße mit Bestandteilen der äußeren Zellmembran assoziiert ist.

5. Die im Hinblick auf die Lokalisation aufgestellte Hypothese, daß das rb-Protein bei der Aufnahme von Rifamycinen in die Zelle beteiligt ist, wurde durch Vergleich der [^3H]Rifampicin-Aufnahme von ganzen und schockbehandelten Zellen untersucht. Die Hypothese konnte dadurch nicht experimentell belegt, jedoch auch nicht eindeutig widerlegt werden.

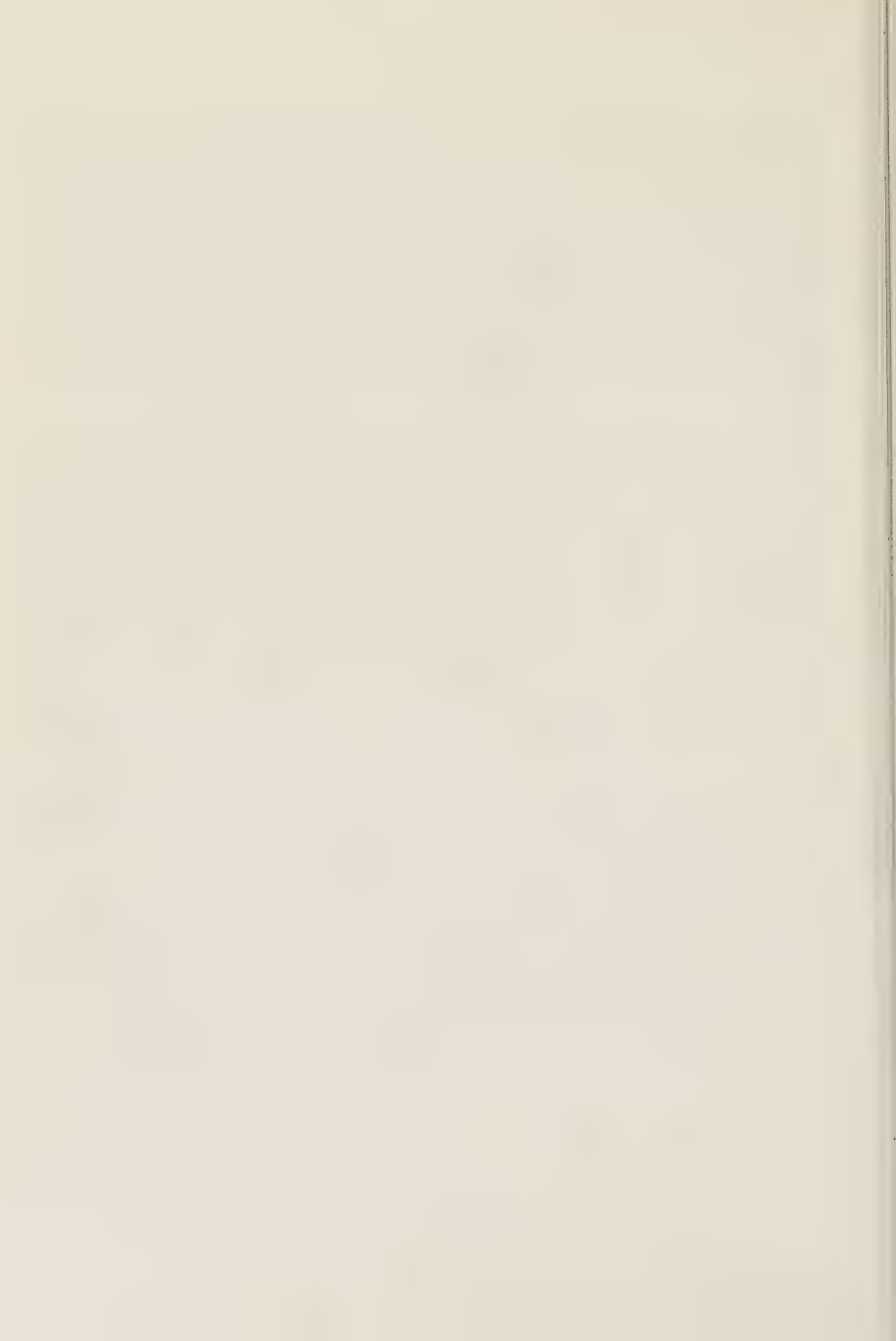
6. Bei der Aufnahme von Antibiotika in die Bakterienzelle sind Fälle bekannt, bei denen an der Bindung bzw. dem Transport von Nährstoffen beteiligte Proteine mißbraucht werden. In diesem Zusammenhang erfolgte eine Überprüfung des rb-Proteins auf Aktivität der Protease I aus dem Periplasma von E.coli, eines Enzyms, das ähnlich groß wie das rb-Protein ist und ein den Rifamycinen in gewissen Strukturelementen ähnliches Substrat zu lysieren vermag. Es erwies sich jedoch, daß Protease I und rb-Protein verschiedene Proteine sind. Auch ein Vergleich mit anderen im Periplasma oder in der äußeren Membran lokalisierten Proteinen läßt keine Schlüsse auf eine anderweitige Funktion des rb-Proteins zu.

7. Einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen zur Funktion des Proteins bietet die Beobachtung, daß das rb-Protein in stationären Zellen 1.4fach gegenüber exponentiellen Zellen angereichert ist.

8. Eine eindeutige Entscheidung für oder gegen eine mögliche Beteiligung des rb-Proteins bei der Aufnahme von Rifamycinen in die Zelle dürfte erst durch das Auffinden einer geeigneten Mutante möglich sein, deren veränderte Aufnahmeeigenschaften für Rifamycine mit einem in seinen Eigenschaften veränderten rb-Protein in Zusammenhang gebracht werden können.

Abkürzungsverzeichnis

CNBr-Sephrose	Cyanbromid-aktivierte Sepharose
Dimethyl-POPOP	1,4-bis-2(-4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-
DTE	1.4.-Dithioerythrit Benzol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
h	Stunden
IpM	Impulse pro Minute
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante
K_D	Dissoziationskonstante
min	Minuten
PPO	2,5-Diphenyloxazol
rb-Protein	rifampicinbindendes bzw. rifamycin- bindendes Protein
RSA	Rinderserumalbumin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan - HCl-Puffer (Molaritätsangabe gilt für Tris)
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen



Lebenslauf

Ich wurde am 26. August 1950 in Schwäbisch Hall geboren.

Meine Eltern sind Dr. med. Wolfgang Böltz und seine

Frau Anny, geb. Hönes.

1957 - 1961	Volksschule in Schwäbisch Hall
1961 - 1965	Gymnasium bei St. Michael in Schwäbisch Hall (altsprachlich)
1965	Umzug nach Hürth, Landkreis Köln
1965 - 1969	Gymnasium der Gemeinde Hürth (neusprachlich)
Juni 1969	Reifeprüfung am Gymnasium der Gemeinde Hürth
1969 - 1972	Studium der Chemie an der Universität Köln
November 1971	Diplom-Vorprüfung
1972 - 1975	Fortsetzung des Studiums an der Universität Freiburg i. Br.
Juli 1974	Diplom-Hauptprüfung
September 1974 - März 1975	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. K. Wallenfels am Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.
Mai 1975 - Juni 1978	Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. G. Hartmann am Institut für Biochemie der Universität München

Seit 1975 bin ich mit Dr. Rüdiger Seydel, Diplommathematiker,
verheiratet.

